

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

JULIANI GISELLI PRESTES

AVALIAÇÃO DA EFICÁCIA DO TRATAMENTO DO LIXIVIADO PRODUZIDO NO
ATERRO SANITÁRIO DA CAXIMBA USANDO OS INDICADORES BIOLÓGICOS
DE *Diplodon parodizi* E *Corbicula fluminea*.

CURITIBA

2019

JULIANI GISELLI PRESTES

AVALIAÇÃO DA EFICÁCIA DO TRATAMENTO DO LIXIVIADO PRODUZIDO NO
ATERRO SANITÁRIO DA CAXIMBA USANDO OS INDICADORES BIOLÓGICOS
DE *Diplodon parodizi* E *Corbicula fluminea*.

Dissertação apresentada ao curso de Pós-Graduação em Ecologia e Conservação, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ecologia e Conservação.

Orientadora: Profa. Dra. Lucélia Donatti

CURITIBA

2019

Universidade Federal do Paraná. Sistema de Bibliotecas.
Biblioteca de Ciências Biológicas.
(Dulce Maria Bieniara – CRB/9-931)

Prestes, Juliani Giselli

Avaliação da eficácia do tratamento do lixiviado produzido no Aterro Sanitário da Caximba usando os indicadores biológicos de *Diplodon parodizi* e *Corbicula fluminea*. / Juliani Giselli Prestes. – Curitiba, 2019. 75 p.: il.

Orientador: Lucélia Donatti

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Conservação.

1. Bivalves 2. Antioxidantes 3. Aterros sanitários 4. Citocromo P-450 CYP1A1 I. Título II. Donatti, Lucélia III. Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Conservação.

CDD (20. ed.) 574.5268



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
SETOR SETOR DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO ECOLOGIA E
CONSERVAÇÃO - 40001016048P6

TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em ECOLOGIA E CONSERVAÇÃO da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da dissertação de Mestrado de **JULIANI GISELLI PRESTES** intitulada: **Avaliação da eficácia do tratamento do lixiviado produzido no Aterro Sanitário da Caximba usando os indicadores biológicos de *Diplodon parodizi* e *Corbicula fluminea***, após terem inquirido a aluna e realizado a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua aprovação no rito de defesa.

A outorga do título de mestre está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

CURITIBA, 26 de Abril de 2019.

LUCELIA DONATTI

Presidente da Banca Examinadora (UFPR)

TATIANA HERRERIAS

Avaliador Externo (UNICENTRO)

SILVIA ROMÃO

Avaliador Externo (UFFS)

AGRADECIMENTOS

À Deus, pelo dom da vida.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ecologia e conservação da Universidade Federal do Paraná, pelo apoio no decorrer do mestrado.

Ao CNPq, pelo fomento indispensável para a realização desse trabalho.

À CAPES, pela concessão de bolsa durante o curso de mestrado.

À Prefeitura Municipal de Curitiba e administração do Aterro Sanitário da Caximba, por permitir a coleta do lixiviado usado para o desenvolvimento do trabalho.

À Professora Dra. Lucélia Donatti, pela orientação, apoio e dedicação para a realização desse trabalho.

Ao Professor Dr. Mauricio Osvaldo Moura, pelo auxílio estatístico e valiosas sugestões.

À Dra. Tatiana Herrerias, pelas valiosas sugestões para o desenvolvimento dessa dissertação.

À Dra. Priscila Krebsbach Kandalsk, por me ajudar, com muita paciência e dedicação, no aprendizado das técnicas usadas para o desenvolvimento desse trabalho.

À Dra. Cintia Machado pela paciência, insistência e excelência para a adequação de técnicas desafiadoras.

À Dra. Maria Rosa D. Pedreiro de Souza, por seu auxílio em vários aspectos do trabalho.

À Dra. Vanessa A. dos Anjos, pelo auxílio para adequação e desenvolvimento de técnicas e dicas muito importantes no desenvolvimento dessa dissertação.

À Elen de Arruda Marins por sua amizade, conselhos, conversas e apoio técnico durante todo o mestrado deixando-o mais leve.

À Ananda Karla Alves Neundorf, pelo apoio técnico, fundamental para o desenvolvimento do trabalho.

Ao Bruno A. Cepeluski pelo apoio nas coletas e pelo companheirismo que deixou o período do desenvolvimento desse trabalho mais leve.

À minha família, que sempre dão grande apoio em minha vida. Em especial a minha mãe que sempre esteve ao meu lado, superando todas as divergências.

A todos que contribuíram, direta ou indiretamente, para a realização dessa dissertação.

Quando o homem aprender a respeitar até o menor ser da criação, seja animal ou vegetal, ninguém precisará ensiná-lo a amar seus semelhantes.

(Albert Schweitzer, Nobel da Paz, 1952)

RESUMO

A urbanização causa problemas ambientais como a deposição de lixo, que quando inadequada gera contaminação por lixiviado em solo e corpos hídricos. Uma ferramenta para avaliar o impacto do lixiviado é o uso de bioindicadores como os bivalves límnicos, uma vez que são filtradores, sedentários e respondem a alterações ambientais em curto período de tempo. Este trabalho avaliou a ação do lixiviado e a eficácia dos estágios de tratamento feito pelo Aterro Sanitário da Caximba, Curitiba/PR, em diferentes concentrações, no metabolismo celular dos bivalves límnicos *Corbicula fluminea* (n = 90) e *Diplodon parodizi* (n = 54) coletados na APA do rio Verde, Campo Magro/PR. Os animais coletados foram levados para laboratório com temperatura controlada de 20°C, e mantidos em água desclorada por 12 dias. Após período de aclimação, os animais permaneceram nas concentrações de lixiviado de 3% e 10%, para o lixiviado coletado em estado bruto (Ponto A), pós tratamento físico-químico (Ponto B) e após saída da terceira *wetland* (Ponto C). Para cada situação experimental houve um grupo controle, mantidos em água desclorada. Os animais ficaram expostos ao lixiviado por 7 dias, em seguida foram eutanasiados e as brânquias congeladas em nitrogênio líquido. Em ambas as espécies foram analisados o mecanismo de resistência multixenobiótica (MXR) e defesas antioxidantes enquanto que ethoxyresorufin-O-deethylase (EROD) e proteínas semelhantes a metalotioneína (MT) foram analisados somente em *D. parodizi*. O MXR não variou entre os tratamentos para as duas espécies, o que pode indicar a inativação do MXR. A MT e a lipoperoxidação (LPO) em *D. parodizi*, não variaram entre os tratamentos o que está associado com a não alteração das concentrações de metais entre os pontos de coleta. Para *C. fluminea*, o nível de glutathione-S-transferase (GST) foi maior no ponto A que nos pontos B e C. *D. parodizi* teve maior atividade da GST no ponto B, que também apresentou maior atividade de glutathione redutase (GR), fornecedora de glutathione reduzida (GSH). A baixa atividade de GST no ponto A foi associada ao efeito hormético. *D. parodizi* apresentou maiores níveis de superóxido dismutase (SOD) no ponto A que em B e C, assim como a EROD e a glutathione peroxidase (GPx), o que está de acordo com o esperado para os tratamentos. Para *C. fluminea* a SOD teve menor nível no ponto A que em B e C, enquanto a GPx não alterou entre os tratamentos. As diferenças nas respostas entre as espécies, pode indicar que para *C. fluminea* os componentes do lixiviado inibiram a atividade da SOD, comprometendo a capacidade do organismo de defender-se, deixando as células mais exposta aos danos. Para *D. parodizi* a glucose-6-fosfato desidrogenase (G6PDH) foi inibida nos pontos com maior carga poluidora e nas maiores concentrações de lixiviado, enquanto que em *C. fluminea* a G6PDH não alterou entre os tratamentos, demonstrando diferentes padrões de resposta entre as espécies. As respostas dos marcadores nos bivalves mostram que o tratamento empregado pelo Aterro Sanitário da Caximba tem sido eficaz. *Corbicula fluminea* e *Diplodon parodizi* apontam os efeitos negativos para populações de bivalves em corpos hídricos contaminados com lixiviado, pois ambas as espécies foram sensíveis aos contaminantes presentes no lixiviado.

Palavras-chave: Bivalves. Defesas antioxidantes. Ethoxyresorufin-O-deethylase (EROD). Aterro sanitário de Caximba. Biomarcadores.

ABSTRACT

Urbanization causes environmental problems such as the deposition of garbage, which when inadequate generates contamination by leachate in soil and water bodies. One tool to evaluate the impact of leachate is the use of bioindicators such as limestone bivalves, since they are sedentary filterers and respond to environmental changes in a short period of time. This work evaluated the effect of the leachate and the effectiveness of the treatment stages performed by the Caximba Sanitary Landfill, Curitiba / PR, in different concentrations, on the cellular metabolism of the limbic bivalves *Corbicula fluminea* (n = 90) and *Diplodon parodizi* (n = 54) collected in the APA of the Verde River, Campo Magro / PR. The animals collected were taken to the laboratory with a controlled temperature of 20 ° C and kept in dechlorinated water for 12 days. After a period of acclimation, the animals remained in leachate concentrations of 3% and 10% for the leachate collected in the raw state (Point A), after physical-chemical treatment (Point B) and after leaving the third wetland (Point C). For each experimental situation there was a control group, kept in dechlorinated water. The animals were exposed to the leachate for 7 days, then euthanized and the gills frozen in liquid nitrogen. In both species the mechanism of multi-xenobiotic resistance (MXR) and antioxidant defenses were analyzed, while ethoxyresorufin-O-deethylase (EROD) and metallothionein-like proteins (MT) were analyzed only in *D. parodizi*. MXR did not vary between treatments for both species, which may indicate MXR inactivation. The MT and lipoperoxidation (LPO) in *D. parodizi* did not vary among the treatments, which is associated with the non-alteration of the concentrations of metals between the collection points. For *C. fluminea*, the level of glutathione-S-transferase (GST) was higher at point A than at points B and C, *D. parodizi* had higher GST activity at point B, which also had higher activity of glutathione reductase (GR), a supplier of reduced glutathione (GSH). The low GST activity at point A was associated with the hormonal effect. *D. parodizi* presented higher levels of superoxide dismutase (SOD) at point A than in B and C, as well as EROD and glutathione peroxidase (GPx), which is in line with that expected for the treatments. For *C. fluminea* SOD had lower level at point A than in B and C, while GPx did not change between treatments. Differences in responses between species may indicate that for *C. fluminea* the leachate components inhibited SOD activity, compromising the body's ability to defend itself, leaving the cells more exposed to damage. For *D. parodizi*, glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PDH) was inhibited at the points with the highest pollutant load and at the highest concentrations of leachate, while in *C. fluminea* the G6PDH did not change among the treatments, demonstrating different response patterns between the species. The responses of the markers in the bivalves show that the treatment used by the Caximba Sanitary Landfill has been effective. *Corbicula fluminea* and *Diplodon parodizi* indicate the negative effects for populations of bivalves in water bodies contaminated with leachate, since both species were sensitive to the contaminants present in the leachate.

Keywords: Bivalves. Antioxidant defenses. Ethoxyresorufin-O-deethylase (EROD). Caximba Sanitary landfill. Biomarkers.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – MAPA DA ÁREA DE COLETA DOS BIVALVES LÍMNICOS, LOCALIZADA NA BACIA DO RIO VERDE, CAMPO MAGRO, ESTADO DO PARANÁ, BRASIL.....	20
FIGURA 2 – CONCHAS DE BIVALVES DE ÁGUA LÍMNICOS COLETADOS NA REGIÃO DO RIO VERDE, CAMPO MAGRO, PARANÁ, BRASIL.	22
FIGURA 3 – ESQUEMA EXPERIMENTAL	25

LISTA DE GRÁFICOS

- GRÁFICO 1 – RESPOSTA DA SOD (SUPERÓXIDO DISMUTASE) EM *C. fluminea* EXPOSTOS AO LIXIVIADO COLETADO NO ATERRO SANITÁRIO DA CAXIMBA, CURITIBA-PR, NOS PONTOS A (BRUTO), B (APÓS TRATAMENTO FÍSICO-QUÍMICO) E C (SAÍDA DA TERCEIRA WETLAND) E NAS DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE 0% (CONTROLE), 10% E 3%. **Erro! Indicador não definido.**4
- GRÁFICO 2 – RESPOSTA DA GST (GLUTATIONA-S-TRANSFERASE) EM *C. fluminea* EXPOSTOS AO LIXIVIADO COLETADO NO ATERRO SANITÁRIO DA CAXIMBA, CURITIBA-PR, NOS PONTOS A (BRUTO), B (APÓS AO TRATAMENTO FÍSICO-QUÍMICO) E C (SAÍDA DA TERCEIRA WETLAND)...35
- GRÁFICO 3 –RESPOSTA DA SOD (SUPERÓXIDO DISMUTASE) EM *D. parodizi* EXPOSTOS AO LIXIVIADO COLETADO NO ATERRO SANITÁRIO DA CAXIMBA, CURITIBA-PR, NOS PONTOS A (BRUTO), B (APÓS AO TRATAMENTO FÍSICO-QUÍMICO) E C (SAÍDA DA TERCEIRA WETLAND). **Erro! Indicador não definido.**8
- GRÁFICO 4 – RESPOSTA DA SOD (SUPERÓXIDO DISMUTASE) EM *D. parodizi* EXPOSTOS AO LIXIVIADO COLETADO NO ATERRO SANITÁRIO DA CAXIMBA, CURITIBA-PR, NAS DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE 0% (CONTROLE), 10% E 3%. **Erro! Indicador não definido.**8
- GRÁFICO 5 – RESPOSTA DA GST (GLUTATIONA-S-TRANSFERASE) EM *D. parodizi* EXPOSTOS AO LIXIVIADO COLETADO NO ATERRO SANITÁRIO DA CAXIMBA, CURITIBA-PR, NOS PONTOS A (BRUTO), B (APÓS AO TRATAMENTO FÍSICO-QUÍMICO) E C (SAÍDA DA TERCEIRA WETLAND). .. **Erro! Indicador não definido.**9
- GRÁFICO 6 – RESPOSTA DA GST (GLUTATIONA-S-TRANSFERASE) EM *D. parodizi* EXPOSTOS AS LIXIVIADO COLETADO NO ATERRO SANITÁRIO DA CAXIMBA, CURITIBA-PR, NAS DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE 0% (CONTROLE), 10% E 3%. **Erro! Indicador não definido.**9

GRÁFICO 7 – RESPOSTA DA GPX (GLUTATIONA PEROXIDASE) EM <i>D. parodizi</i> EXPOSTOS AO LIXIVIADO COLETADO NO ATERRO SANITÁRIO DA CAXIMBA, CURITIBA-PR, NOS PONTOS A (BRUTO), B (APÓS AO TRATAMENTO FÍSICO-QUÍMICO) E C (SAÍDA DA TERCEIRA WETLAND).	40
GRÁFICO 8 – RESPOSTA DA GPx (GLUTATIONA PEROXIDASE) EM <i>D. parodizi</i> EXPOSTOS AO LIXIVIADO COLETADO NO ATERRO SANITÁRIO DA CAXIMBA, CURITIBA-PR , NAS DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE 0% (CONTROLE), 10% E 3%..	41
GRÁFICO 9 – RESPOSTA DA GR (GLUTATIONA REDUTASE) EM <i>D. parodizi</i> EXPOSTOS AO LIXIVIADO COLETADO NO ATERRO SANITÁRIO DA CAXIMBA, CURITIBA-PR, NOS PONTOS A (BRUTO), B (APÓS AO TRATAMENTO FÍSICO-QUÍMICO) E C (SAÍDA DA TERCEIRA WETLAND).	42
GRÁFICO 10 – RESPOSTA DA GR (GLUTATIONA REDUTASE) EM <i>D. parodizi</i> EXPOSTOS AO LIXIVIADO COLETADO NO ATERRO SANITÁRIO DA CAXIMBA, CURITIBA-PR, NAS DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE 0% (CONTROLE), 10% E 3%.	42
GRÁFICO 11 – RESPOSTA DA G6PDH (GLUCOSE-6-FOSFATO DESIDROGENASE) EM <i>D. parodizi</i> EXPOSTOS AO LIXIVIADO COLETADO NO ATERRO SANITÁRIO DA CAXIMBA, CURITIBA-PR, NOS PONTOS A (BRUTO), B (APÓS AO TRATAMENTO FÍSICO-QUÍMICO) E C (SAÍDA DA TERCEIRA WETLAND).....	43
GRÁFICO 12 – RESPOSTA DA G6PDH (GLUCOSE-6-FOSFATO DESIDROGENASE) EM <i>D. parodizi</i> EXPOSTOS AO LIXIVIADO COLETADO NO ATERRO SANITÁRIO DA CAXIMBA, CURITIBA-PR, NAS DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE 0% (CONTROLE), 10% E 3%.	44
GRÁFICO 13 – RESPOSTA DA EROD (ETHOXYRESORUFIN-O-DEETHYLASE) EM <i>D. parodizi</i> EXPOSTOS AO LIXIVIADO COLETADO NO ATERRO SANITÁRIO DA CAXIMBA, CURITIBA-PR, NOS PONTOS A (BRUTO), B (APÓS AO TRATAMENTO FÍSICO-QUÍMICO) E C (SAÍDA DA TERCEIRA WETLAND).	46

LISTA DE TABELAS

- TABELA 1 – RESULTADOS DAS ANÁLISES DE PARÂMETROS FÍSICO-QUÍMICOS DO LIXIVIADO DO ATERRO SANITÁRIO DA CAXIMBA, CURITIBA-PR, NOS PONTOS DE COLETA A, B E C. **Erro! Indicador não definido.**
- TABELA 2 – RESULTADOS DAS ANÁLISES DOS METAIS PESADOS DO LIXIVIADO DO ATERRO SANITÁRIO DA CAXIMBA, CURITIBA-PR, NOS PONTOS DE COLETA A, B E C. **Erro! Indicador não definido.**
- Nenhuma entrada de índice de ilustrações foi encontrada.**
- TABELA 5 – VALORES DA MÉDIA \pm ERRO-PADRÃO DA MÉDIA DA ATIVIDADE DAS ENZIMAS DO ESTRESSE OXIDATIVO ANALIZADAS EM *D. parodizi* EXPOSTOS AO LIXIVIADO DO ATERRO SANITÁRIO DA CAXIMBA, CURITIBA-PR.35
- TABELA 6 – RESULTADO DA ANÁLISE DE VARIÂNCIA MULTIVARIADA (MANOVA) PARA OS EFEITOS DO PONTO, CONCENTRAÇÃO E INTERAÇÃO ENTRE PONTO E CONCENTRAÇÃO NAS ENZIMAS DO ESTRESSE OXIDATIVO ANALISADOS EM *D. parodizi* EXPOSTOS AO LIXIVIADO DO ATERRO SANITÁRIO DA CAXIMBA, CURITIBA-PR.36
- TABELA 7 – VALORES DA MÉDIA \pm ERRO-PADRÃO DA MÉDIA VALORES DA MÉDIA \pm ERRO-PADRÃO DA MÉDIA DO NÍVEL DOS MARCADORES DO METABOLISMO CELULAR ANALISADOS EM *D. parodizi* EXPOSTOS AO LIXIVIADO DO ATERRO SANITÁRIO DA CAXIMBA, CURITIBA-PR.44
- TABELA 8 – RESULTADO DA ANÁLISE DE VARIÂNCIA MULTIVARIADA PARA OS EFEITOS DO PONTO, CONCENTRAÇÃO E INTERAÇÃO ENTRE PONTO E CONCENTRAÇÃO DOS MARCADORES DO METABOLISMO CELULAR ANALISADOS EM *D. parodizi* EXPOSTOS AO LIXIVIADO DO ATERRO SANITÁRIO DA CAXIMBA, CURITIBA-PR.45

LISTA DE ABREVIATURAS OU SIGLAS

ANOVA	- Análise de variância univariada
APA	- Área de Proteção Ambiental
CAT	- Catalase
Cd	- Cádmio
CDNB	-1-cloro-2,4-dinitrobenzeno
CEMA	- Conselho Estadual de Meio Ambiente
CONAMA	- Conselho Nacional de Meio Ambiente
Cu	- Cobre
DTNB	- 5'5-Ditiobis (2-nitrobenzoico ácido)
DOC	- Carbono orgânico dissolvido
EDTA	- Ácido etileno diamino tetracético (do inglês Ethylenediaminetetracetic Acid)
EPM	- Erro padrão da média
EROD	- Ethoxyresorufin-O-deethylase
EROs	- Espécies reativas de oxigênio
ETE	- Estação de Tratamento de Efluentes
G6PDH	- Glucose-6-fosfato desidrogenase
GPx	- Glutathione peroxidase
GR	- Glutathione reductase
GSH	- Glutathione reduzida
GSSG	- Glutathione dissulfeto (glutathione oxidada)
GST	- Glutathione-S-transferase
HCl	- Ácido clorídrico
LPO	- Peroxidação lipídica (do inglês lipid peroxidation)
MANOVA	- Análise multivariada da variância
MDA	- malondialdeído
MT	- Proteínas semelhantes a metalotioneína
MXR	- Mecanismo de resistência multixenobiótica
NADP	- Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato
NADP+	- Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato oxidada.
NADPH	- Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzida
NBT	- Azul de nitrotetrazólio

PAHs	- Hidrocarbonetos aromáticos policíclicos
Pb	- Chumbo
PCBs	- Bifenilos policlorados
PBS	- Tampão fosfato salino (do inglês phosphate buffer saline)
RSU	- Resíduos sólidos urbanos
SOD	- Superóxido dismutase
TCA	- Ciclo dos ácidos tricaboxílicos (do inglês tricarboxylic acid cycle)
Zn	- Zinco

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
1.1 ATERRO SANITÁRIO DA CAXIMBA	17
1.2 LOCAL DE COLETA E ESPÉCIES ESTUDADAS	20
2 OBJETIVOS	23
2.1 OBJETIVO GERAL	23
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS:	23
3 MATERIAIS E MÉTODOS	24
3.1 COLETAS E MANUTENÇÃO DOS BIVALVES LÍMNICOS	24
3.2 COLETAS DO LIXIVIADO	24
3.3 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL	25
3.4 MÉTODOS ANALÍTICO	26
3.4.1 Determinação da atividade enzimática: enzimas antioxidantes	27
3.4.2 Peroxidação lipídica (LPO)	28
3.4.3 Mecanismo de resistência multixenobiótica (MXR)	28
3.4.4 Proteínas semelhantes a metalotioneína (MT)	29
3.4.5 Ethoxyresorufin-O-deethylase (EROD)	29
3.5 ANÁLISES ESTATÍSTICAS	30
4 RESULTADOS	31
4.1 PARÂMETROS FÍSICO-QUÍMICOS DO LIXIVIADO	31
4.2 ANÁLISES ENZIMÁTICAS DE <i>CORBICULA FLUMINEA</i>	32
4.3 ANÁLISES ENZIMÁTICAS DE <i>DIPLODON PARODIZI</i>	35
5 DISCUSSÃO	47
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS	53
REFERÊNCIAS	54
ANEXOS	62
ANÁLISE FÍSICO-QUÍMICA DO LIXIVIADO DOS PONTOS DE COLETA	62
AUTORIZAÇÃO PARA ATIVIDADES COM FINALIDADE CIENTÍFICA.	72

1 INTRODUÇÃO

A urbanização, o crescimento populacional e o consumo desenfreado têm contribuído para o aumento mundial de resíduos sólidos urbanos (RSU) o que ocasiona uma série de problemas de ordem social, econômica e sanitária, com impactos em escala local, como a contaminação do solo, águas superficiais e subterrâneas e em escala global, como as emissões de gases de efeito estufa, principalmente metano e dióxido de carbono, são relatados (ATTA et al. 2015; WU et al. 2015).

O lixiviado é um líquido de coloração escura, gerado pela degradação de resíduos sólidos urbanos que ficam expostos ao contato com a água e bactérias decompositoras. A composição do lixiviado inclui grandes quantidades de contaminantes orgânicos como hidrocarbonetos em suspensão e fenol, e inorgânicos como metais pesados, sais, amônia, nitrogênio, fósforo e alta concentração de sólidos suspensos (JONES et al., 2006; ABBAS et al., 2009 DI BELLA et al. 2012, ZAIRI et al., 2014).

A avaliação do risco desta mistura complexa é muitas vezes difícil de determinar pela sua variabilidade química, assim como pelas interações entre seus compostos e degradação tóxica com a biota no meio ambiente (TSARPALI et al., 2012). Os lixiviados de aterros sanitários são classificados como águas residuais problemáticas, representam fonte de poluição para o meio ambiente (KJELDSEN et al., 2002) assim como para a saúde humana (OMAN e JUNESTEDT, 2008), quando não tratados adequadamente. São considerados fonte potencial de contaminação dos solos e das águas subterrâneas e de superfície (OMAN e JUNESTEDT, 2008; YANG et al., 2013) pois pequenas quantidades podem poluir um grande volume de águas superficiais, sendo classificados como águas residuais problemáticas (MATEJCZYK et al., 2011).

Os impactos do lixiviado ao entrar em contato com o ambiente e na biota local podem ser avaliados através do uso de bioindicadores, uma vez que esses podem responder a contaminação por alterações de sua fisiologia, ou sua capacidade para acumular elementos ou substâncias. A resposta de cada organismo está fortemente relacionada com as condições físicas, químicas e biológicas do ambiente assim como, pelas suas condições fisiológicas, morfológicas, estruturais e nutricionais (MARTELETO et al., 2009).

Os bivalves límnicos são animais bentônicos sedentários, filtradores ativos e são considerados bioindicadores, já que vivem enterrados no substrato de corpos hídricos por longos períodos, aumentando a probabilidade de exposição desses organismos a contaminantes dissolvidos e particulados (RODRIGUES et al., 2012). Estas características fazem com que sejam utilizados em estudos de avaliação da contaminação de ambientes, seja por metais ou outros contaminantes (O'CONNOR, 2002). Em relação as espécies alvo do presente estudo, o molusco asiático *Corbicula fluminea* (Müller, 1744) tem sido foco de estudos toxicológicos, incluindo a abordagem de biomarcadores (SANTOS e MARTINEZ, 2014), enquanto que para *Diplodon parodizi* (Bonetto, 1962) espécie nativa brasileira, não foram encontrados estudos relacionados a esse tema.

Os biomarcadores moleculares e celulares são ferramentas de avaliação e de monitoramento ambiental capazes de detectar os efeitos da exposição química em organismos aquáticos antes de se tornarem significativos ecologicamente e para a conservação (LONG et al., 2004; VIEIRA et al., 2016). São definidos como variações induzidas por xenobióticos em componentes moleculares ou celulares, ou funções, determináveis em sistemas biológicos ou amostras (DEPLEDGE et al., 1995). Os biomarcadores podem fornecer informações sensíveis e biologicamente relevantes e podem servir como uma medida integrativa dos efeitos das misturas de estressores químicos (WANG et al., 2012; WERNERSSON et al., 2016). Como não há um único biomarcador que possa refletir o estado geral de saúde dos organismos, tem sido recomendado que uma bateria de biomarcadores seja usada para entender as respostas adaptativas às condições ambientais (VIEIRA et al., 2016; CAZENAVE et al., 2009).

Diante do exposto acima, entender a ação do lixiviado de um aterro sanitário, sobre as respostas fisiológicas e celulares de invertebrados pode contribuir para a tomada de decisão em relação ao gerenciamento de resíduos sólidos urbanos, visando diminuir a contaminação ambiental.

1.1 ATERRO SANITÁRIO DA CAXIMBA

A área de estudo é o Aterro Sanitário da Caximba, que está localizado na cidade de Curitiba-PR, Brasil, próximo às coordenadas 25°62'73,88" S e 49°33'42,38" W. O Aterro iniciou sua operação em 20 de novembro de 1989 para

receber os resíduos sólidos urbanos (RSU) das cidades de Curitiba, Almirante Tamandaré e São José dos Pinhais. Antes de seu encerramento em 31/10/2010, além de Curitiba, dezessete municípios da Região Metropolitana de Curitiba dispunham seus RSU no Aterro, chegando a receber em média 2.400 toneladas diárias. A área total do aterro é de 1.123.119,18 m², incluindo as lagoas de tratamento do lixiviado (NETO et al., 2012) sendo a área para disposição de resíduos de 439.540 m². Atualmente o aterro está em fase de controle e revitalização ambiental.

O Aterro Sanitário da Caximba trata o lixiviado produzido por tratamento convencional (físico-químico) e complementar, com o uso de *wetlands* para fazer a fitorremediação do efluente. A primeira etapa se inicia com a saída do lixiviado, ainda bruto, do local onde o lixo foi disposto durante o funcionamento do Aterro. O lixiviado bruto, chega no desarenador em forma de canal duplo caracterizando o ponto A de coleta deste trabalho e, passa em seguida, por um conjunto de quatro lagoas sendo a primeira de equalização, com aeradores para homogeneização, volume de 1.500 m³ e tempo de detenção de aproximadamente 26 dias. As duas lagoas seguintes são de disposição paralela, com volume de 6.750 m³, com 9 aeradores mecânicos e tempo de detenção de aproximadamente 23 dias. Finalmente, o lixiviado pode passar por uma lagoa facultativa, dividida em 4 partes, com volume total de 49.529 m³ e tempo de detenção de aproximadamente 86 dias. Após passagem pelas lagoas o lixiviado é transferido para a Estação de Tratamento de Efluentes (ETE), onde passa por um tratamento físico-químico à base de oxidante (dicloroisocianurato de sódio) e segue para o sistema de tratamento de Lodos Ativados e Decantadores Secundários. A ETE é composta por três tanques de preparo de reagente, dois decantadores primários (floccodcantadores), três reatores aeróbios, cada um com 150 m³, dois aeradores submersíveis e dois decantadores secundários. Na saída da ETE o lixiviado foi coletado caracterizando o Ponto B de coleta deste trabalho.

O tratamento do lixiviado do Aterro da Caximba, descrito acima, não atende todas as diretrizes do Conselho Estadual do Meio Ambiente (CEMA) n° de licença normativa 086:2013, que estabelece diretrizes e critérios orientadores para o licenciamento ambiental e outorga projeto, implantação, operação e encerramento de aterros sanitários no Brasil. No que diz respeito ao parâmetros físico-químicos do lixiviado que pode ser lançado no meio ambiente, o Aterro Sanitário da Caximba

adotou um sistema composto por três *wetlands* naturais, localizados no entorno do Aterro, visando o pós-tratamento do lixiviado. Esse sistema hidrológico de *wetlands* foi implementado em fevereiro de 2011 e atualmente o volume do efluente que sai do sistema de tratamento é de aproximadamente $24 \text{ m}^3\text{h}^{-1}$.

Além do lixiviado os *wetlands* possuem seu próprio sistema hidrológico devido ao lençol freático aflorante, acrescido das águas superficiais de drenagem e precipitação. A base e as laterais dos *wetlands* são compostas por argila e areia, que ocorrem naturalmente na área. Os *wetlands* possuem desníveis para que o escoamento do efluente ocorra em fluxo contínuo e os taludes foram reforçados para evitar que em época de cheias as águas do Rio Iguaçu retornem para os *wetlands*.

O primeiro *wetland* é caracterizado por apresentar a maior diversidade de macrófitas aquáticas, porem a dominância foi observada para a espécie *Echinochloa polystachya* (H.B.K.) Hitchcock, e recebe o lixiviado que sai do tratamento do aterro, numa vazão média de $24 \text{ m}^3\text{h}^{-1}$. Apresenta uma área de aproximadamente 15.424 m^2 , com profundidade média de 1,6 m, volume de 17.969 m^3 e tempo de detenção hidráulica de aproximadamente 31 dias.

O segundo *wetland* é caracterizado por apresentar como espécie dominante *Alternanthera philoxeroides* (Mart.) Griseb. Apresenta uma área de aproximadamente 35.724 m^2 , com profundidade média de 1,3 m, volume de 47.870 m^3 e tempo de detenção hidráulica de aproximadamente 84 dias.

O terceiro *wetland* apresenta como espécie dominante *Eichhornia crassipes* (Mart.) Solms., sendo totalmente coberto pelas macrófitas. Apresenta uma área de aproximadamente 19.993 m^2 , com profundidade média de 1 m, volume de 19.923 m^3 e tempo de detenção hidráulica de aproximadamente 35 dias. Neste *wetland* ocorre o ponto de lançamento do lixiviado para o Rio Iguaçu, onde foi coletado o lixiviado do Ponto C.

Um trabalho que monitorou os *wetlands* do Aterro Sanitário da Caximba durante 2 anos estimando a área de cobertura das macrófitas, demonstrou que os *wetlands* naturais tinham uma eficiência média de 75% e 63% para a demanda bioquímica e química de oxigênio respectivamente, 84% para o nitrogênio amoniacal, 89% para o nitrogênio total e 70% para o fósforo. As concentrações de metais pesados nas raízes, assim como nos ramos de *E. crassipes* e *polystachya*, demonstraram que tais espécies realizam fitoextração para Cd e Pb, acumulando estes metais na biomassa (PREUSSLER et al., 2014).

Após passar sequencialmente pelos *wetlands*, o lixiviado é lançado em outros *wetlands* naturais que desembocam no Rio Iguaçu. Anteriormente a implementação de *wetlands* o efluente tratado pelo sistema convencional do Aterro era conduzido por canal aberto o qual se encontrava com um córrego de águas límpidas que desembocava em um *wetland* natural, próximo do Rio Iguaçu.

1.2 LOCAL DE COLETA E ESPÉCIES ESTUDADAS

A área de proteção ambiental do rio Verde, estabelecida pelo governo do estado do Paraná (decreto número 2.375 / 2000), está localizada no lado oeste da Região Metropolitana de Curitiba. Inclui três municípios: Araucária, Campo Largo e Campo Magro (CANEPARO et al. 2012) (FIGURA 1). A sub-bacia do rio Verde faz parte da bacia do rio Iguaçu. Ao longo de seu curso, o potencial hídrico do rio Verde é explorado, fornecendo recursos hídricos às propriedades rurais e gerando energia (MEDEIROS et al. 2011). O local de estudo compreende um trecho do rio Verde, localizado no Município de Campo Magro, Paraná, Brasil.

FIGURA 1 – MAPA DA ÁREA DE COLETA DOS BIVALVES LÍMNICOS, LOCALIZADA NA BACIA DO RIO VERDE, CAMPO MAGRO, ESTADO DO PARANÁ, BRASIL.



FONTE: Meyer et al., 2017.

Os bivalves límnicos são moluscos filtradores, sem uma região cefálica definida, que possuem um pé simples aderido à massa visceral, dois pares de brânquias e apresentam duas valvas de carbonato de cálcio que são secretadas pelo manto e que envolvem o corpo do animal (BRUSCA e BRUSCA, 2007). Os bivalves límnicos têm um papel importante na modificação do meio ambiente por meio de alterações diretas ou indiretas nas condições bióticas e abióticas, sendo considerados “engenheiros do ecossistema” (CROOKS, 2002). Devido à sua capacidade de filtrar grandes quantidades de água, bivalves límnicos interferem diretamente na dinâmica dos nutrientes através da filtração de elementos orgânicos que estão em suspensão na água, além de excreção e biodeposição de fezes e pseudofezes (VAUGHN e HAKENKAMP, 2001).

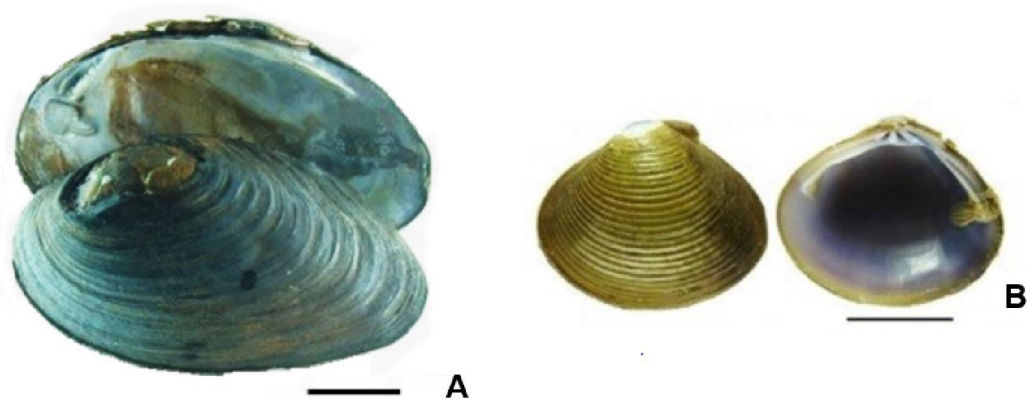
As espécies de bivalves são sensíveis a alterações ambientais, como poluição química e orgânica. Consequentemente, esses organismos são eficazes como indicadores de qualidade ambiental (VIDIGAL et al. 2005, PRATHER et al. 2012, RODRIGUES et al. 2012) e por este motivo são utilizados para a avaliação da contaminação de ambientes, seja por metais ou outros contaminantes, sendo considerados bons bioindicadores (O'CONNOR, 2002).

Corbicula fluminea (Müller, 1744) (FIGURA 2B), pertencente à família Corbiculidae (Ordem Veneroida), é predominante na área de estudo e sua densidade populacional crescente pode determinar o declínio das populações de bivalves nativos (MEYER et al., 2017). Além de ser exótica, possui características de espécies invasoras, como a rápida maturação sexual, alta capacidade reprodutiva e o considerável poder adaptativo nos ambientes colonizados, sejam naturais ou artificiais, dulcícolas ou salobros (DARRIGAN, 1997). Vários estudos toxicológicos têm usado *C. fluminea* como modelo biológico (PELTIER et al. 2008; FEDATO et al., 2010; OLIVEIRA et. al, 2016; 2014), uma vez que é considerado um indicador de contaminação aquática devido à sua alta sensibilidade a uma ampla gama de contaminantes e a taxa de filtração (GOLDBERG, 1975).

Diplodon parodizi (Bonetto, 1962) (FIGURA 2A), pertencente à família Hyriidae (ordem Unionoida), possui registros de ocorrência na América do Sul, especificamente na Argentina, no Paraguai e no Brasil (PEREIRA et al., 2013) nas bacias da Amazônia e do Paraná (SIMONE, 2006). Na APA do rio Verde é encontrado em baixa densidade (MEYER et al., 2017). O conhecimento sobre a

espécie é restrito à descrição morfológica fornecida por Bonetto (1962). No território brasileiro, dez espécies do gênero *Diplodon*, possuem *status* de espécie ameaçada, principalmente devido à poluição dos rios, desmatamento e competição com espécies exóticas (MACHADO et al., 2008).

FIGURA 2 – CONCHAS DE BIVALVES DE ÁGUA LÍMNICOS COLETADOS NA REGIÃO DO RIO VERDE, CAMPO MAGRO, PARANÁ, BRASIL.



FONTE: O autor (2019).

LEGENDA: *Diplodon parodizi* (BONETTO, 1962) (A) E *Corbicula fluminea* (MÜLLER, 1774) (B).
BARRA DE ESCALA = 1 CM.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Verificar a eficácia dos diferentes estágios de tratamento do lixiviado produzido no Aterro Sanitário da Caximba, Curitiba/PR, utilizando os biomarcadores *Diplodon parodizi* e *Corbicula fluminea*.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- Avaliar a ação do lixiviado em diferentes estágios de tratamento e concentrações do Aterro Sanitário da Caximba no sistema de defesas antioxidantes das brânquias de *Diplodon parodizi* através da quantificação dos níveis de atividade das enzimas: superóxido dismutase (SOD), glutathione-s-transferase (GST), glutathione peroxidase (GPx), glutathione reductase (GR) e glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PDH).

- Avaliar a ação do lixiviado em diferentes estágios de tratamento e concentrações do Aterro Sanitário da Caximba nos níveis das enzimas do sistema oxidativo superóxido dismutase (SOD), glutathione-s-transferase (GST), glutathione peroxidase (GPx) e glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PDH), nas brânquias de *Corbicula fluminea*.

- Avaliar a ação do lixiviado em diferentes estágios de tratamento e concentrações do Aterro Sanitário da Caximba nos marcadores ethoxyresorufin-O-deethylase (EROD), proteínas semelhantes a metalotioneína (MT), e lipoperoxidação lipídica (LPO) nas brânquias de *Diplodon parodizi*.

- Comparar o mecanismo de resistência multixenobiótica (MXR) nos bivalves límnicos *Corbicula fluminea* e *Diplodon parodizi* expostos ao lixiviado em diferentes estágios de tratamento e concentração do Aterro Sanitário da Caximba.

- Avaliar a eficácia dos diferentes tratamentos do lixiviado produzido no Aterro Sanitário da Caximba usando marcadores biológicos de *D. parodizi* e *C. fluminea*.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 COLETAS E MANUTENÇÃO DOS BIVALVES LÍMNICOS.

Os bivalves foram coletados na APA do rio Verde em um trecho do rio localizado próximo as coordenadas 25°23'223" S e 43°27'040" W, no município de Campo Magro/PR. A coleta foi manual por métodos de catação, Tateando-se o leito do rio em busca dos animais. Foram selecionados indivíduos maiores que 15 mm de comprimento para *C. fluminea* (n=90; peso médio: 4,89 g) e maiores que 50 mm de comprimento para *D. parodizi* (n=54; peso médio: 55,24 g), para que os exemplares de ambas as espécies fossem considerados adultos (MORTON, 1977; HENRY e SIMÃO, 1984), visando a padronização de faixa etária.

Em seguida foram transportados em caixas com água do rio e aeração constante, para o Laboratório de Biologia Adaptativa – Departamento de Biologia Celular – Setor de Ciências Biológicas/UFPR, onde foram mantidos em aquários com água desclorada, sendo *C. fluminea* = 10 indivíduos por aquário, com 885 ml de água e *D. parodizi* = 6 indivíduos por aquário, com 6 litros de água (a quantidade de água foi calculada usando a média da massa de indivíduos de cada espécie), com aeração constante, iluminação natural, fotoperíodo de 16 horas luz/ 8 horas escuro e temperatura da sala de 20°C durante 12 dias visando aclimação. No oitavo dia de aclimação foi realizada uma troca de água dos aquários.

3.2 COLETAS DO LIXIVIADO

Foram coletadas amostras de lixiviado em três pontos do Aterro Sanitário da Caximba em diferentes estágios de tratamento. O primeiro ponto (A) foi logo após a saída do Aterro onde o lixiviado é considerado bruto, pois não passou ainda por intervenção, o segundo ponto (B) foi logo após a saída da ETE, onde o lixiviado já havia passado pelo tratamento convencional (físico químico) e o último ponto (C) na saída da terceira *wetland*, após ter passado pelo tratamento complementar (esquema experimental, FIGURA 3). As amostras de cada ponto (A, B e C) foram recolhidas em frascos de vidro escuro limpos (frascos âmbar) e mantidas em caixas de isopor, para manter a temperatura de coleta, até chegar no laboratório.

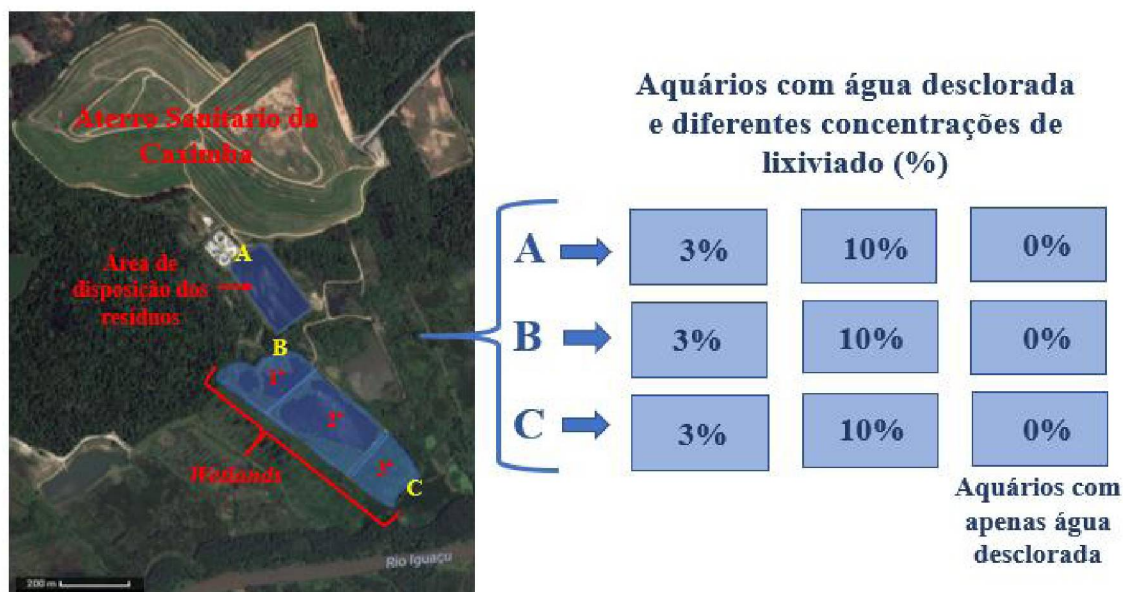
Foram realizadas, de acordo com o *Standard Methods for Examination of Water and Wastewater* (SMWW) (APHA, 2005), para cada ponto de coleta, análises físico-químicas do lixiviado, sendo elas, de pH, oxigênio dissolvido (OD), alcalinidade, DBO, DQO, nitrogênio amoniacal, nitrogênio total, nitrito, nitrato, fósforo total e metais pesados (Cu, Cr, Pb, Zn, Ni, Cd).

A coleta do lixiviado nos três pontos estabelecidos ocorreu no mesmo dia em que os animais foram expostos experimentalmente ao lixiviado, descritos detalhadamente em 3.3., uma vez que o lixiviado é uma mistura variável e complexa de compostos, dessa forma suas características podem ser alteradas, em condições abióticas diferentes, como temperatura e umidade (JONES et al. 2006).

3.3 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Após o período de aclimação, os animais foram expostos ao lixiviado, proveniente das coletas (pontos A, B e C), durante 7 dias, e em concentrações de 3% e 10% volume/volume. O número de animais por aquário foi de 10 indivíduos para *C. fluminea* e de 6 indivíduos para *D. parodizi*. Para cada situação experimental, havia um aquário controle com água desclorada e sem lixiviado, conforme esquema representado na FIGURA 3. Fatores abióticos permaneceram idênticos aos utilizados no período de aclimação (temperatura sala = 20°C; fotoperíodo = 16 luz/8 escuro, aeração contínua). Parâmetros abióticos da água como pH, temperatura, oxigênio dissolvido, amônia e nitrato foram mensurados diariamente. Animais encontrados mortos eventualmente foram retirados e feitos o registro. Os animais não foram alimentados durante o período experimental (OLIVEIRA et al., 2014, 2016 com modificações).

FIGURA 3 – ESQUEMA EXPERIMENTAL.



FONTE: O autor (2017).

LEGENDA: letras em amarelo indicam pontos de coleta do lixiviado em cada etapa do tratamento, onde A é o lixiviado antes do tratamento (composto bruto), B é efluente pós-tratamento do Aterro e C saída das *wetlands* (tratamento complementar).

Após o período experimental os animais foram eutanasiados, com os músculos adutores anteriores cortados, permitindo que as valvas se abrissem. As brânquias foram retiradas e imediatamente congeladas em nitrogênio líquido para as análises bioquímicas. Carcaças e água contaminada com lixiviado foram descartadas no sistema de coleta de lixo tóxico da UFPR – Setor de Ciências Biológicas.

3.4 MÉTODOS ANALÍTICOS

As brânquias foram analisadas, pois possuem papel central nas trocas gasosas e por estarem em contato direto com os contaminantes presentes na água. As brânquias de ambas as espécies foram homogeneizadas em tampão fosfato-salino (PBS), exceto para análises em *D. parodizi* de proteínas semelhantes a metalotioneína (MT), peroxidação lipídica (LPO) e ethoxyresorufin-O-deethylase (EROD). A determinação da concentração de proteínas foi feita pelo método de Bradford. As análises enzimáticas foram realizadas à 20°C.

3.4.1 Determinação da atividade enzimática: enzimas antioxidantes

Para a determinação das enzimas antioxidantes, depois de homogeneizadas, as amostras foram centrifugadas a 12.000 g a 4°C por 20 minutos e retirado o sobrenadante da alíquota. As amostras foram analisadas por espectrofotometria em leitora de microplacas Epoch (EPOCH Microplate Spectrophotometer, BioTek, Winooski, VT, USA) em triplicata. Os resultados foram expressos em mU/mg de proteína. Uma unidade de enzima é definida como a quantidade de enzima capaz de consumir 1 μ mol de substrato ou formar 1 μ mol de produto por minuto por miligrama de proteína (mU/mg de proteína) e a SOD em U/mg de proteína. As enzimas SOD, GST, GPx e G6PDH, foram verificadas em ambas as espécies e para *D. parodizi*, adicionalmente, foram verificadas as atividades de GR.

A atividade da superóxido dismutase (SOD; EC 1.15.1.1) foi realizada em tampão carbonato de sódio 100 mM (pH 10,2), contendo EDTA 17,5 μ M e cloreto de nitro azul tetrazólio (NBT) 1 mM. A reação teve início pela adição de hidroxilamina para concentração final de 3,7 mM. O aumento de absorbância foi acompanhado em 560 nm (CROUCH et al., 1981).

A atividade da glutathione s-transferase (GST; EC 2.5.1.18), foi avaliada após a conjugação do grupo tiol da glutathione reduzida (GSH) ao substrato de 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB), dissolvido em etanol, para a concentração final de 1,5 mM, onde forma-se como produto da reação, o conjugado GS-DNB, o qual foi mensurado espectrofotometricamente em 340 nm. A taxa de aumento da absorção é diretamente proporcional à atividade de GST (KEEN et al., 1976 com modificações).

A atividade da glutathione peroxidase (GPx; EC 1.11.1.9), foi acompanhada espectrofotometricamente através da oxidação de NADPH a 340 nm. No meio de reação composto por tampão fosfato de sódio 0,1M (pH 7,0), a enzima utiliza glutathione reduzida (GSH a 2 mM) para reduzir um peróxido orgânico originando glutathione dissulfídica (GSSG). Esta última é reduzida pela enzima glutathione redutase (GR a 1 U/ml) utilizando elétrons doados pelo NADPH (0,2 mM) (WENDEL, 1981).

A atividade da glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PDH; EC 1.1.1.49), foi determinada em meio de reação contendo tampão Tris-HCl 100 mM (pH 7,4),

glicose-6-fosfato 1 mM e NADP⁺ 0,2 mM. O princípio do método baseia-se na reação de oxidação de glicose-6-fosfato catalisada pela G6PDH, com a formação de NADPH+H⁺, que pode ser acompanhada em 340 nm (CIARDELLO et al., 1995).

A atividade da glutathione redutase (GR; EC 1.8.1.7), foi mensurada em meio de reação composto por tampão fosfato de potássio (100 mM, pH 7,0), EDTA 1 mM, NADPH 0,1 mM e glutathione oxidada 1 mM. Através da oxidação do NADPH com a concomitante redução da glutathione dissulfídica (GSSG) foi acompanhado o decréscimo da absorbância em 340 nm (CARLBERG e MANNERVIK, 1975).

3.4.2 Peroxidação lipídica (LPO)

Para a determinação da peroxidação lipídica (LPO) em *D. parodizi*, foi estimada pela quantificação dos produtos finais da peroxidação lipídica, dentre eles o malondialdeído (MDA), pelo método de TBARS (substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico) utilizando o malondialdeído-(bis)-acetato (MDA, Merck, Darmstadt, Germany) como padrão. Para isso foi pesado 0,1g do tecido e homogeneizado em 500 µl de Tampão Tris-HCl 50 mM, centrifugado por 20 minutos a 14.000 rpm a 4°C. Após, foram realizados pré-tratamento da amostra de 50 µl da amostra com 100 µl de TCA 10%, deixado em banho de gelo por 5 minutos e centrifugado por 5 minutos a 14.000 rpm.

A mistura foi incubada a 60°C por 60 minutos, em meio ácido. A reação de MDA com o TBA (ácido tiobarbitúrico) forma um produto rosa que pode ser medido espectrofotometricamente a 535 nm. Os resultados foram expressos µmols de MDA/g de tecido (FEDERICI et al., 2007 com modificações).

3.4.3 Mecanismo de resistência multixenobiótica (MXR)

O teste para acumulação de fluorescência de rodamina B (substrato de P-gp) foi realizado de acordo com Kurelec et al. (2000), nas duas espécies, para avaliar o mecanismo de resistência multixenobiótica (MXR). Neste ensaio, um aumento na fluorescência acumulada representa uma redução no MXR. As brânquias foram pesadas e mantidas ex vivo em uma solução de 1 mM de rodamina B durante 2 horas. Em seguida as brânquias foram lavadas em água desclorada, homogeneizadas em água destilada (1:5 -w / v) e centrifugadas (1700 g; 7 min; 4°C).

A fluorescência correspondente à rodamina B acumulada foi medida (544/590 nm) e as concentrações foram determinadas por uma curva padrão de rodamina, com os dados expressos em μM de Rodamina B / g de tecido.

3.4.4 Proteínas semelhantes a metalotioneína (MT)

A concentração de proteínas semelhantes a metalotioneína (MT) foi determinado seguindo a metodologia descrita por Viarengo et al. (1997) com modificações, em *D. parodizi*. As brânquias foram homogeneizadas (1: 5-p / v) em tampão (sacarose 0,5 M, Tris 26 mM, fluoreto de fenilmetilsulfonilo 0,5 mM, p-mercaptoetanol 1,3 mM), centrifugadas durante 45 min (18.650 g; 4°C) e o sobrenadante foi submetido a fração de etanol / ácido clorofórmio para obter uma fração de metaloproteína parcialmente purificada. Nesta fração, os grupos sulfidrílo (-SH) foram quantificados em um espectrofotômetro (Tecan Infinite® M200) a 412 nm, usando o reagente de Ellman. A glutatona reduzida (GSH) foi utilizada como padrão e o conteúdo de metalotioneína foi expresso em nmol GSH/mg de proteína ou nmol GSH .mg de proteína⁻¹.

3.4.5 Ethoxyresorufin-O-deethylase (EROD)

A atividade de CYP1A foi determinada pela análise da ethoxyresorufin-O-deethylase (EROD) no tecido, neste caso, as brânquias de *D. parodizi*, que foi estimada pela taxa de conversão de 7-etoxresorfinina em resorufina, de acordo com o protocolo de Eggens e Galgani (1992), com modificações. A reação foi iniciada pela adição da amostra à mistura reativa (Tampão TRIS-base 50mM, NaCl 0,1M pH 7,8, NADPH 2 mM e 7-etoxiresufluina 0,1 mM). A excitação foi feita em $\lambda=530$ nm e a emissão foi medida em $\lambda=590$ nm (BURKE et al., 1985). O aumento progressivo da fluorescência resultante da formação de resorufina foi medido em intervalos de 1 minuto por 20 minutos. Os resultados foram obtidos através da relação entre a inclinação da reta obtida a partir de registros da intensidade de fluorescência das amostras e a inclinação da reta da curva padrão de resorufina. A atividade de EROD foi expressa em pmol resorufin/min/mg de proteína (ou pmol resorufin.min⁻¹.mg de proteína⁻¹).

3.5 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

As análises estatísticas foram realizadas utilizando o programa R (R Core Team 2017). Para determinar se o ponto de coleta, as concentrações utilizadas de lixiviado e a interação entre essas variáveis preditoras afetam os marcadores de danos oxidativos e celulares foi usado um modelo de variância multivariada fatorial (MANOVA). Para cada efeito significativo das variáveis preditoras, testes a posteriori (anova univariada, Fox e Weisberg, 2011) foram aplicados a cada variável resposta com o pacote lsmeans (Lenth, 2016).

4 RESULTADOS

Houve a morte de 2 indivíduos durante o experimento, um *C. fluminea* na concentração de 10% no sétimo dia de exposição ao lixiviado do ponto B, após o tratamento convencional (físico-químico) e um *D. parodizi* na concentração 10% no terceiro dia de exposição ao lixiviado bruto (Ponto A).

4.1 PARÂMETROS FÍSICO-QUÍMICOS DO LIXIVIADO

Os valores dos parâmetros físico-químicos analisados no lixiviado nos três pontos de coletas (A, B e C) (ANEXOS) podem ser observados na Tabela 1. Na Tabela 2 metais pesados do lixiviado foram analisados nos três pontos (A, B e C) de coletas.

TABELA 1 – RESULTADOS DAS ANÁLISES DE PARÂMETROS FÍSICO-QUÍMICOS DO LIXIVIADO DO ATERRO SANITÁRIO DA CAXIMBA, CURITIBA-PR, NOS PONTOS DE COLETA A, B E C.

Parâmetros	Ponto A (lixiviado bruto)	Ponto B (tratamento físico químico)	Ponto C (saída da terceira wetland)	CEMA 086/13
Carbono Orgânico (*) (mg/L)	477	288	102	ND
Demanda Bioquímica de Oxigênio-DBO5 (mgO2/L)	74,71	19,53	14,49	ND
Demanda Bioquímica de Oxigênio Solúvel –DBO5 (mgO2/L)	50,36	18,71	11,79	ND
Demanda Bioquímica de Oxigênio-DBO20 (mgO2/L)	260,55	156,26	58,5	ND
Demanda Química de Oxigênio DQO (mgO2/L)	1.158,70	792,4	423	ND
Demanda Química de Oxigênio Solúvel-DQO (mgO2/L)	867,5	716,1	327,8	ND
Fenóis Totais (mg/L)	< 0,05	< 0,05	< 0,05	0,5
Nitrogênio Amoniacal (mgN-NH3/L)	1.183,39	139,6	2,86	20,0
Nitrito (mgNNO3-/L)	NM	84,41	< 0,11	ND
Nitrito (mgN-NO2-/L)	NM	128,71	< 0,15	ND
Óleos e Graxas Animais/Vegetais (mg/L)	< 15	< 15	< 15	50
Óleos Minerais (mg/L)	< 15	< 15	< 15	20

FONTE: O autor (2019).

LEGENDA: Não mensurado (NM). Não definido (ND). Conselho Estadual do Meio Ambiente (CEMA) nº de licença normativa 086:2013 que estabelece diretrizes e critérios orientadores para o licenciamento ambiental no Brasil.

TABELA 2 – RESULTADOS DAS ANÁLISES DOS METAIS PESADOS DO LIXIVIADO DO ATERRO SANITÁRIO DA CAXIMBA, CURITIBA-PR, NOS PONTOS DE COLETA A, B E C.

Metais	Ponto A (lixiviado bruto)	Ponto B (tratamento físico químico)	Ponto C (saída da terceira wetland)	CEMA 086/13
Arsênio (mg/L)	< 0,10	<0,10	< 0,10	0,50
Bário (mg/L)	0,29	0,19	0,11	5,00
Boro (mg/L)	0,6	0,57	0,45	5,00
Cádmio (mg/L)	< 0,05	<0,05	< 0,05	0,20
Chumbo (mg/L)	0,01	<0,01	< 0,01	0,50
Cobre Dissolvido (mg/L)	< 0,05	<0,05	< 0,05	1,00
Cromo Total (mg/L)	0,11	0,1	0,07	ND
Cromo Trivalente (mg/L)	0,06	<0,05	< 0,05	1,00
Cromo Hexavalente (mg/L)	0,05	0,06	0,05	0,10
Estanho (mg/L)	<0,10	<0,10	< 0,10	4,00
Ferro Dissolvido (mg/L)	1,93	2,83	1,49	15,00
Manganês Dissolvido (mg/L)	0,48	0,28	0,15	1,00
Mercúrio (mg/L)	<0,001	<0,001	< 0,001	0,01
Níquel (mg/L)	0,07	0,07	0,04	2,00
Prata (mg/L)	<0,05	<0,05	< 0,05	0,10
Selênio (mg/L)	<0,10	<0,10	< 0,10	0,30
Zinco (mg/L)	0,09	0,06	< 0,05	5,00

FONTE: O autor (2019).

LEGENDA: Não definido (ND). Conselho Estadual do Meio Ambiente (CEMA) nº de licença normativa 086:2013 que estabelece diretrizes e critérios orientadores para o licenciamento ambiental no Brasil.

4.2 ANÁLISES ENZIMÁTICAS DE *Corbicula fluminea*

Detalhes referentes aos valores encontrados para as enzimas analisadas em *C. fluminea* nos pontos de coletas (A, B e C) e concentrações de lixiviado (0%, 3% e 10%) podem ser visualizados na Tabela 3.

TABELA 3 – VALORES DA MÉDIA ± ERRO-PADRÃO DA MÉDIA DA ATIVIDADE DOS MARCADORES CELULARES ANALISADOS EM *C. fluminea* EXPOSTOS AO LIXIVIADO DO ATERRO SANITÁRIO DA CAXIMBA, CURITIBA-PR.

(continua)

ENZIMAS	PONTO	CONCENTRAÇÕES		
		0%	3%	10%
SOD	A	3,61 ± 0,31	6,10 ± 0,37	3,52 ± 0,46
	B	7,26 ± 0,67	5,08 ± 0,17	5,78 ± 0,19
	C	7,76 ± 0,52	7,83 ± 0,52	7,90 ± 1,03
GST	Aa	29,82 ± 3,29	36,94 ± 2,23	39,68 ± 4,57
	Bb	18,81 ± 1,16	28,87 ± 1,68	27,49 ± 3,39
	Cc	16,84 ± 2,26	14,59 ± 2,14	13,93 ± 1,95

TABELA 3 – VALORES DA MÉDIA ± ERRO-PADRÃO DA MÉDIA DA ATIVIDADE DOS MARCADORES CELULARES ANALISADOS EM *C. fluminea* EXPOSTOS AO LIXIVIADO DO ATERRO SANITÁRIO DA CAXIMBA, CURITIBA-PR.

(conclusão)

ENZIMAS	PONTO	CONCENTRAÇÕES		
		0%	3%	10%
GPX	A	3,99 ± 0,51	3,56 ± 0,37	4,13 ± 0,75
	B	4,86 ± 0,57	4,26 ± 0,56	4,76 ± 0,52
	C	5,09 ± 0,43	4,36 ± 0,38	3,90 ± 0,27
G6PDH	A	5,32 ± 0,62	5,80 ± 0,62	6,19 ± 0,66
	B	5,55 ± 0,53	5,53 ± 0,02	5,37 ± 0,70
	C	5,36 ± 0,01	5,13 ± 0,71	5,36 ± 0,01
MXR	A	57,45 ± 3,87	56,87 ± 2,72	63,19 ± 3,41
	B	69,66 ± 5,07	60,27 ± 3,81	68,25 ± 2,24
	C	64,02 ± 3,63	66,41 ± 2,96	61,78 ± 4,34

FONTE: O autor (2019).

LEGENDA: Animais expostos a 0% (controle) e 3% e 10% de lixiviado (v/v), nos pontos A, B e C. SOD (superóxido dismutase), GST (glutathione-S-transferase), GPx (glutathione peroxidase), G6PDH (glucose-6-fosfato desidrogenase) e MXR (mecanismo de resistência multixenobiótica). A atividade da SOD expressa em U/mg de proteína, GST, GPx e G6PDH expressas em mU/mg de proteína e MXR expressa em mM de Rodamina B/ g de tecido. Os dados estão expressos como média ± EPM (erro padrão da média). As letras diferentes nas colunas indicam diferenças entre os pontos (A, B e C) ($p \leq 0,05$). Interações entre ponto e concentração não são indicados na tabela.

Para *C. fluminea*, a análise de variância multivariada (MANOVA) está representada na Tabela 4, apontando diferenças significativas para GST e SOD. A GPx, G6PDH e MXR não foram alteradas pelos efeitos do ponto, concentração e interação entre ponto e concentração.

TABELA 4 – RESULTADO DA ANÁLISE DE VARIÂNCIA MULTIVARIADA PARA OS EFEITOS DO PONTO, CONCENTRAÇÃO E INTERAÇÃO ENTRE PONTO E CONCENTRAÇÃO NOS MARCADORES CELULARES DE *C. fluminea* EXPOSTOS AO LIXIVIADO DO ATERRO SANITÁRIO DA CAXIMBA, CURITIBA-PR.

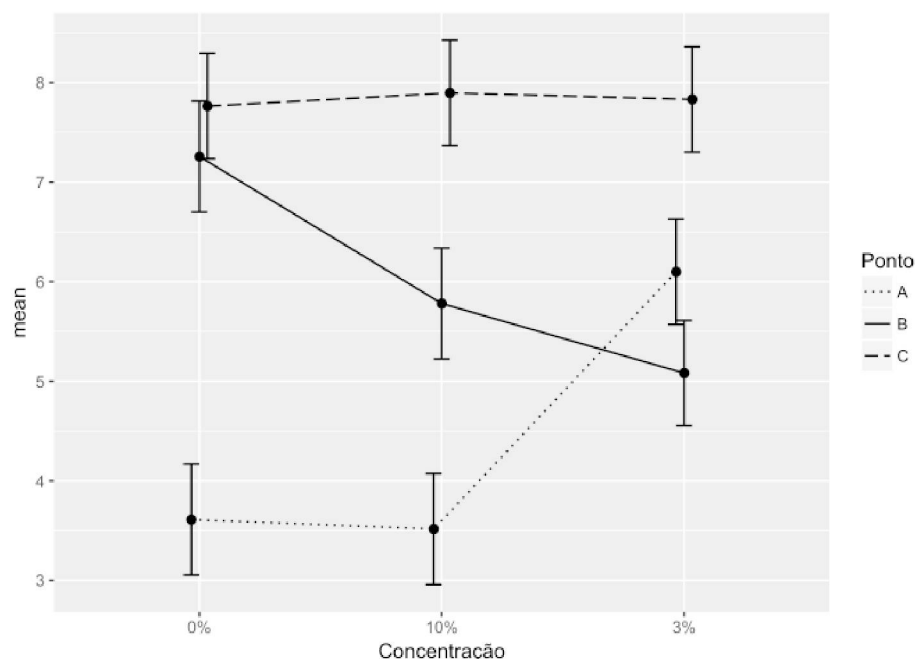
Enzimas	Ponto		Concentração		Ponto: Concentração	
	F	P	F	P	F	P
SOD	27,1055	1,384e-09 *	0,7404	0,4804	0,2962	0,001224 *
GST	44,7655	1,605e-13 *	2,8273	0,06550	2,2176	0,07507
GPx	2,7877	0,06795	1,3557	0,2640	0,5262	0,7168
G6PDH	0,6784	0,5105	0,0636	0,9384	0,3028	0,8752
MXR	2,4293	0,0950	0,7349	0,4830	1,2525	0,2962

FONTE: O autor (2019).

LEGENDA: SOD (superóxido dismutase), GST (glutathione-s-transferase), GPx (glutathione peroxidase) e G6PDH (glicose-6-fosfato desidrogenase) e MXR (mecanismo de resistência multixenobiótica) analisados em *C. fluminea*. Os asteriscos indicam variação estatística significativa ($p \leq 0,05$).

Em *C. fluminea*, a atividade da SOD variou entre os pontos e houve interação entre ponto e concentração. O ponto C apresentou os maiores níveis de SOD quando comparado aos outros pontos e isso em todas as concentrações de lixiviado. No ponto B a SOD diminuiu seus níveis nas concentrações de 3% e 10% de lixiviado quando comparados ao controle (0%) e ao ponto C que apresentaram níveis mais elevados. No ponto A foram observados níveis menores de SOD quando comparados aos pontos B e C, exceto na concentração de 3% de lixiviado, onde a enzima apresentou níveis maiores que em 3% do ponto B (GRÁFICO 1).

GRÁFICO 1 – RESPOSTA DA SOD (SUPERÓXIDO DISMUTASE) EM *C. fluminea* EXPOSTOS AO LIXIVIADO COLETADO NO ATERRO SANITÁRIO DA CAXIMBA, CURITIBA-PR, NOS PONTOS A (BRUTO), B (APÓS TRATAMENTO FÍSICO-QUÍMICO) E C (SAÍDA DA TERCEIRA WETLAND) E NAS DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE 0% (CONTROLE), 10% E 3%.

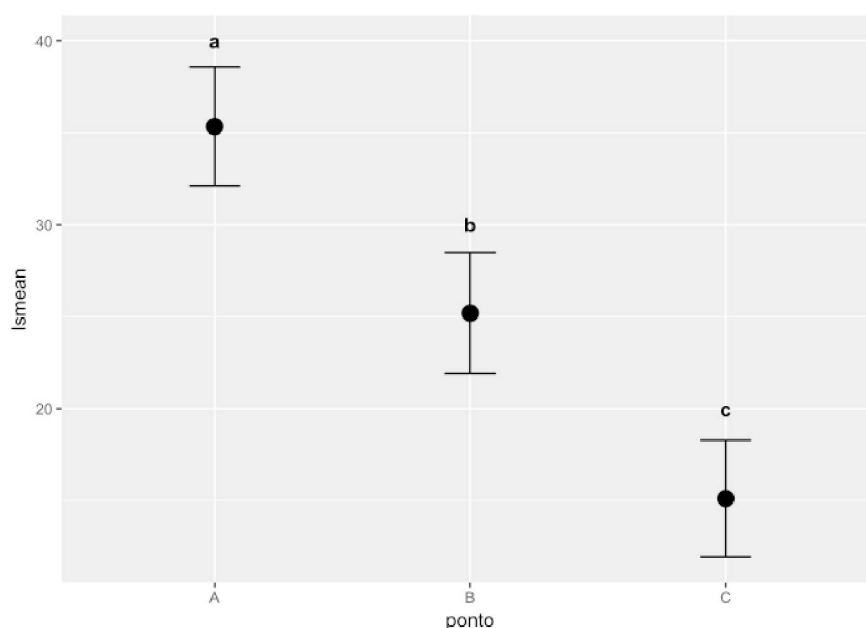


FONTE: O autor (2019).

LEGENDA: Os dados estão expressos como média \pm EPM (erro padrão da média).

A atividade da GST variou entre os pontos, onde foi possível observar que os maiores níveis da enzima ocorreram no ponto A havendo diminuição gradual entre os pontos B e C, sendo que o ponto C apresentou os menores níveis de atividade de GST (GRÁFICO 2).

GRÁFICO 2 – RESPOSTA DA GST (GLUTATIONA-S-TRANSFERASE) EM *C. fluminea* EXPOSTOS AO LIXIVIADO COLETADO NO ATERRO SANITÁRIO DA CAXIMBA, CURITIBA-PR, NOS PONTOS A (BRUTO), B (APÓS AO TRATAMENTO FÍSICO-QUÍMICO) E C (SAÍDA DA TERCEIRA WETLAND).



FONTE: O autor (2019).

LEGENDA: Os dados estão expressos como média \pm EPM (erro padrão da média). Letras diferentes indicam diferenças entre os pontos ($p \leq 0,05$).

4.3 ANALISES ENZIMÁTICAS DE *Diplodon parodizi*

Detalhes referentes aos valores encontrados para as enzimas do estresse oxidativo de *D. parodizi* nos pontos de coletas (A, B e C) e concentrações de lixiviado (0%, 3% e 10%) podem ser visualizados na Tabela 5.

TABELA 5 – VALORES DA MÉDIA \pm ERRO-PADRÃO DA MÉDIA DA ATIVIDADE DAS ENZIMAS DO ESTRESSE OXIDATIVO ANALIZADAS EM *D. parodizi* EXPOSTOS AO LIXIVIADO DO ATERRO SANITÁRIO DA CAXIMBA, CURITIBA-PR.

(continua)

ENZIMAS	PONTO	CONCENTRAÇÕES		
		0%	3%	10%
SOD	Aa	4,62 \pm 0,70a	6,94 \pm 0,26b	6,21 \pm 1,21b
	Bb	3,86 \pm 0,79a	4,36 \pm 0,66b	5,12 \pm 2,64b
	Cb	3,26 \pm 0,81a	5,15 \pm 0,29b	4,91 \pm 0,53b
GST	Aa	28,11 \pm 1,59a	34,83 \pm 5,38b	31,13 \pm 5,14b
	Bb	27,18 \pm 2,64a	43,51 \pm 4,38b	39,64 \pm 2,81b
	Ca	24,22 \pm 2,63a	32,40 \pm 2,53b	37,13 \pm 2,44b

TABELA 5 – VALORES DA MÉDIA ± ERRO-PADRÃO DA MÉDIA DA ATIVIDADE DAS ENZIMAS DO ESTRESSE OXIDATIVO ANALIZADAS EM *D. parodizi* EXPOSTOS AO LIXIVIADO DO ATERRO SANITÁRIO DA CAXIMBA, CURITIBA-PR.

(conclusão)

ENZIMAS	PONTO	CONCENTRAÇÕES		
		0%	3%	10%
GPX	Aa	21,83 ± 2,25a	11,35 ± 1,09b	10,48 ± 2,23b
	Bab	13,67 ± 1,00a	13,01 ± 2,67b	9,09 ± 1,44b
	Cb	10,82 ± 2,39a	7,33 ± 2,24b	10,05 ± 0,96b
GR	Aa	0,10 ± 0,01a	0,22 ± 0,08b	0,31 ± 0,09b
	Bb	0,19 ± 0,08a	0,65 ± 0,18b	0,63 ± 0,09b
	Cab	0,18 ± 0,09a	0,45 ± 0,27b	0,29 ± 0,09b
G6PDH	Aa	8,52 ± 0,97a	4,29 ± 0,62b	8,47 ± 0,76b
	Bb	16,94 ± 1,44a	11,38 ± 1,13b	10,21 ± 0,76b
	Cc	20,62 ± 1,52a	18,92 ± 2,07b	17,44 ± 1,78b

FONTE: O autor (2019).

LEGENDA: Animais expostos a 0% (controle) e 3% e 10% de lixiviado (v/v), nos pontos A, B e C. SOD (superóxido dismutase), GST (glutathiona-S-transferase), GPx (glutathiona peroxidase), GR (glutathiona redutase) e G6PDH (glucose-6-fosfato desidrogenase). A atividade da SOD expressa em U/mg de proteína e GST, GPx, G6PDH e GR expressas em mU/mg de proteína. Os dados estão expressos como média ± EPM (erro padrão da média). As letras diferentes nas colunas indicam diferenças entre as concentrações 0%, 3% e 10%, e nas linhas, diferenças entre os pontos (A, B e C) ($p \leq 0,05$).

Para as enzimas do estresse oxidativo de *D. parodizi*, a MANOVA mostrou que todas as enzimas responderam de forma significativa para os fatores ponto, concentração ou interação entre ponto e concentração (Tabela 6).

TABELA 6 – RESULTADO DA ANÁLISE DE VARIÂNCIA MULTIVARIADA (MANOVA) PARA OS EFEITOS DO PONTO, CONCENTRAÇÃO E INTERAÇÃO ENTRE PONTO E CONCENTRAÇÃO NAS ENZIMAS DO ESTRESSE OXIDATIVO ANALISADOS EM *D. parodizi* EXPOSTOS AO LIXIVIADO DO ATERRO SANITÁRIO DA CAXIMBA, CURITIBA-PR.

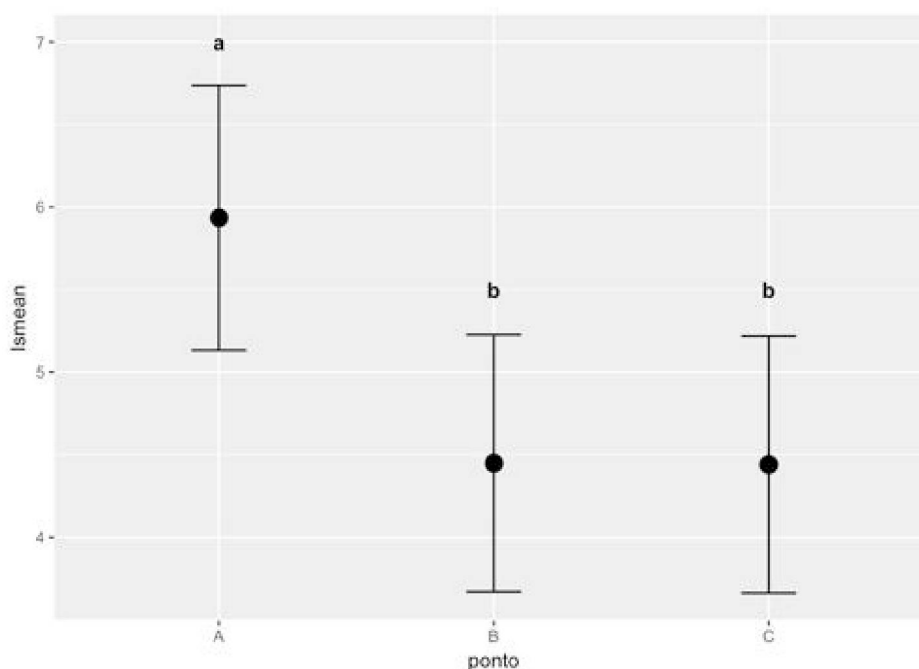
ENZIMAS	PONTO		CONCENTRAÇÃO		PONTO: CONCENTRAÇÃO	
	F	P	F	P	F	P
SOD	5,8189	0,006244 *	4,338	0,020096 *	0,5013	0,734877
GST	3,7041	0,033910 *	5,766	0,006502 *	0,7643	0,555094
GPX	3,5069	0,03993 *	4,9441	0,01235 *	2,0493	0,10685
GR	3,9418	0,02782 *	3,3762	0,04471 *	0,6929	0,60149
G6PDH	53,0372	1,006e-11 *	6,3664	0,004125 *	2,3011	0,076342

FONTE: O autor (2019).

LEGENDA: Animais expostos a 0% (controle) e 3% e 10% de lixiviado (v/v), nos pontos A, B e C. SOD (superóxido dismutase), GST (glutathiona-S-transferase), GPx (glutathiona peroxidase) e GR (glutathiona redutase) e G6PDH (glucose-6-fosfato desidrogenase). Os asteriscos indicam variação estatística significativa ($p \leq 0,05$).

A atividade da SOD variou entre os pontos, onde o ponto A teve os maiores níveis da enzima, quando comparado aos pontos B e C. O controle apresentou os menores níveis de SOD quando comparado as concentrações de 3% e 10% de lixiviado. Os níveis de atividade de SOD, encontrados em *D. parodizi*, quanto ao ponto de coleta e a concentração de lixiviado estão representados nos Gráficos 3 e 4 respectivamente.

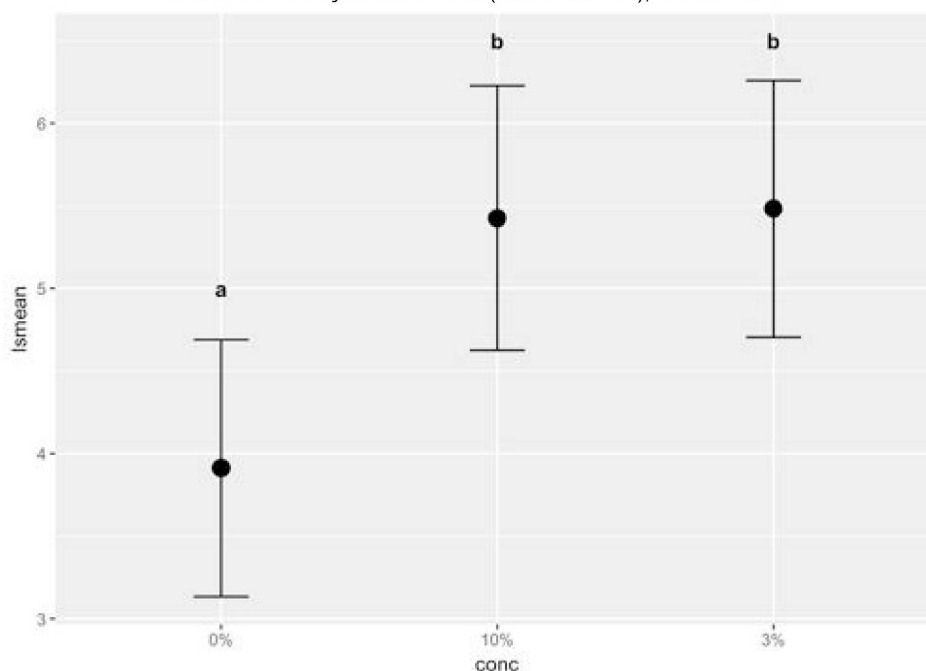
GRÁFICO 3 – RESPOSTA DA SOD (SUPERÓXIDO DISMUTASE) EM *D. parodizi* EXPOSTOS AO LIXIVIADO COLETADO NO ATERRO SANITÁRIO DA CAXIMBA, CURITIBA-PR, NOS PONTOS A (BRUTO), B (APÓS AO TRATAMENTO FÍSICO-QUÍMICO) E C (SAÍDA DA TERCEIRA WETLAND).



FONTE: O autor (2019).

LEGENDA: Letras diferentes indicam diferenças entre os pontos ($p \leq 0,05$). Os dados estão expressos como média \pm EPM (erro padrão da média).

GRÁFICO 4 – RESPOSTA DA SOD (SUPERÓXIDO DISMUTASE) EM *D. parodizi* EXPOSTOS AO LIXIVIADO COLETADO NO ATERRO SANITÁRIO DA CAXIMBA, CURITIBA-PR, NAS DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE 0% (CONTROLE), 10% E 3%.

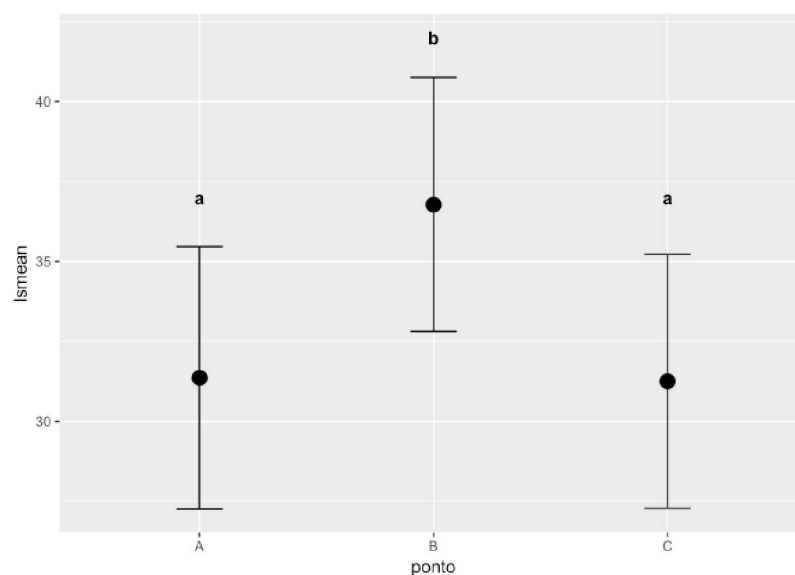


FONTE: O autor (2019).

LEGENDA: Letras diferentes indicam diferenças entre as concentrações ($p \leq 0,05$). Os dados estão expressos como média \pm EPM (erro padrão da média).

A GST teve maior atividade no ponto B, quando comparada aos pontos A e C e apresentou seus menores níveis no controle (0%) quando comparado às concentrações de 10% e 3% de lixiviado, que apresentaram maiores níveis. Os níveis de atividade de GST de *D. parodizi*, para ponto de coleta e concentração de lixiviado, estão representados nos Gráficos 5 e 6, respectivamente.

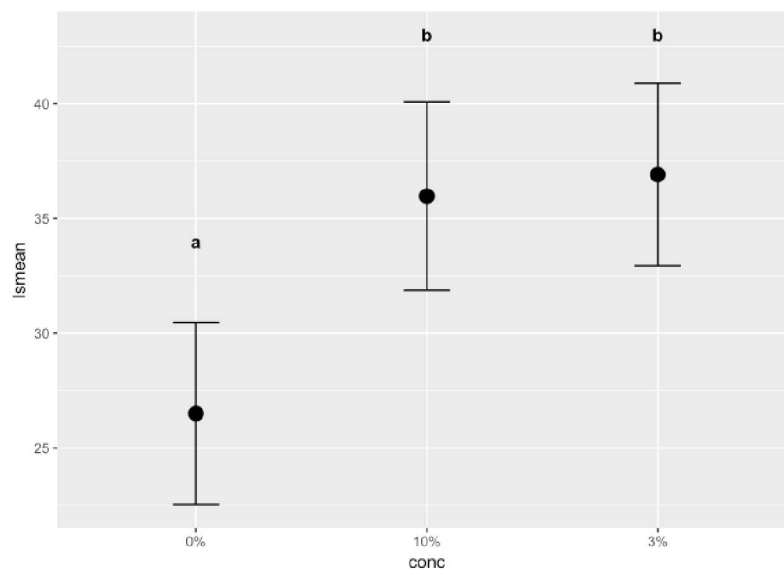
GRÁFICO 5 – RESPOSTA DA GST (GLUTATIONA-S-TRANSFERASE) EM *D. parodizi* EXPOSTOS AO LIXIVIADO COLETADO NO ATERRO SANITÁRIO DA CAXIMBA, CURITIBA-PR, NOS PONTOS A (BRUTO), B (APÓS AO TRATAMENTO FÍSICO-QUÍMICO) E C (SAÍDA DA TERCEIRA WETLAND).



FONTE: O autor (2019).

LEGENDA: Letras diferentes indicam diferenças entre os pontos ($p \leq 0,05$). Os dados estão expressos como média \pm EPM (erro padrão da média).

GRÁFICO 6 – RESPOSTA DA GST (GLUTATIONA-S-TRANSFERASE) EM *D. parodizi* EXPOSTOS AS LIXIVIADO COLETADO NO ATERRO SANITÁRIO DA CAXIMBA, CURITIBA-PR, NAS DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE 0% (CONTROLE), 10% E 3%.

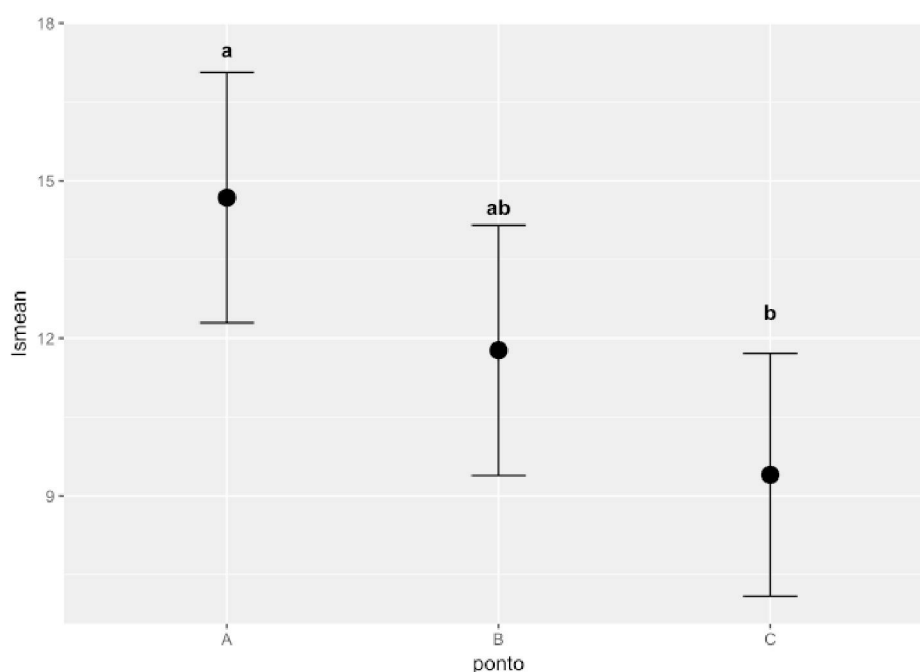


FONTE: O autor (2019).

LEGENDA: Letras diferentes indicam diferenças entre as concentrações ($p \leq 0,05$). Os dados estão expressos como média \pm EPM (erro padrão da média).

A atividade da GPx, variou entre os pontos de coleta, e o ponto A, apresentou os maiores níveis de atividade, quando comparados aos pontos B e C, sendo que a atividade da enzima diminuiu de forma gradual entre os pontos. No entanto, quando analisamos as diferenças entre as concentrações de lixiviado, é possível observar que o controle (0%) apresentou os maiores níveis de atividade e houve diminuição da GPx nas concentrações de 3% e 10% de lixiviado. Os níveis de atividade de GPx em *D. parodizi*, para ponto de coleta e concentração de lixiviado, estão representados nos Gráficos 7 e 8 respectivamente.

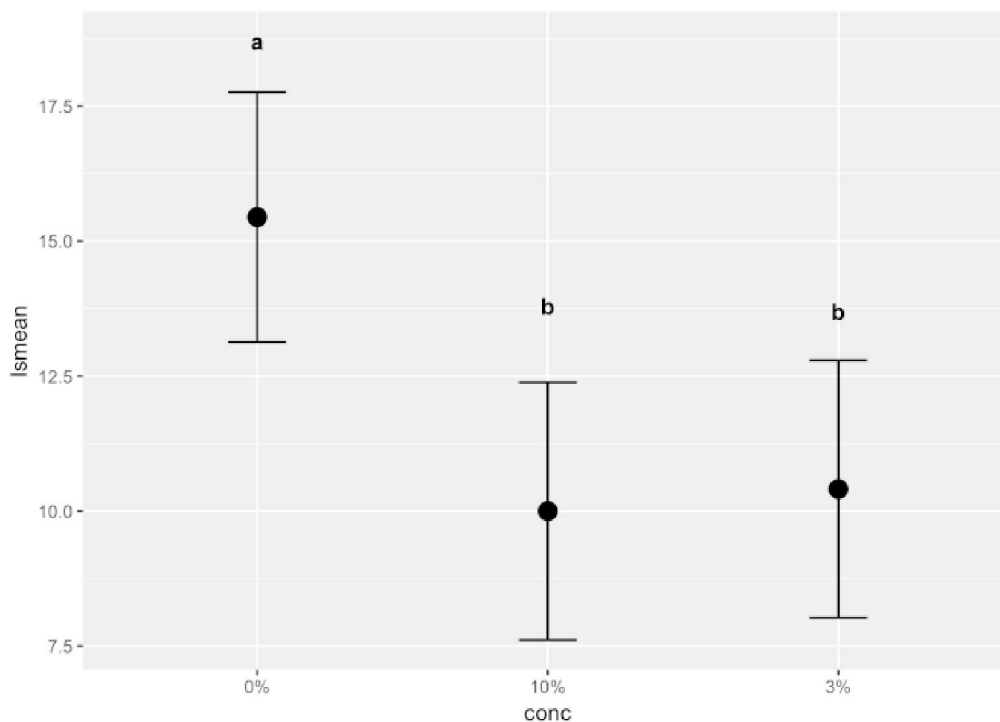
GRÁFICO 7 – RESPOSTA DA GPX (GLUTATIONA PEROXIDASE) EM *D. parodizi* EXPOSTOS AO LIXIVIADO COLETADO NO ATERRO SANITÁRIO DA CAXIMBA, CURITIBA-PR, NOS PONTOS A (BRUTO), B (APÓS AO TRATAMENTO FÍSICO-QUÍMICO) E C (SAÍDA DA TERCEIRA WETLAND).



FONTE: O autor (2019).

LEGENDA: Letras diferentes indicam diferenças entre os pontos ($p \leq 0,05$). Os dados estão expressos como média \pm EPM (erro padrão da média).

GRÁFICO 8 – RESPOSTA DA GPx (GLUTATIONA PEROXIDASE) EM *D. parodizi* EXPOSTOS AO LIXIVIADO COLETADO NO ATERRO SANITÁRIO DA CAXIMBA, CURITIBA-PR, NAS DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE 0% (CONTROLE), 10% E 3%.

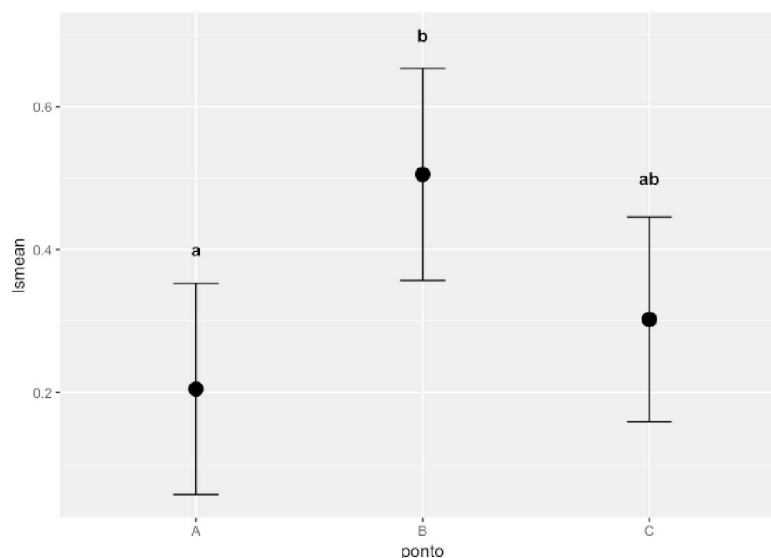


FONTE: O autor (2019).

LEGENDA: Letras diferentes indicam diferenças entre as concentrações ($p \leq 0,05$). Os dados estão expressos como média \pm EPM (erro padrão da média).

Para a GR o ponto com maior nível de atividade da enzima foi o ponto B, enquanto que nos pontos A e C os níveis foram menores. O controle (0%) apresentou os menores níveis de atividade de GR, quando comparado as concentrações de 3% e 10% de lixiviado. Os níveis de atividade da GR de *D. parodizi*, estão representados nos Gráficos 9 e 10, para pontos de coleta e concentração de lixiviado, respectivamente.

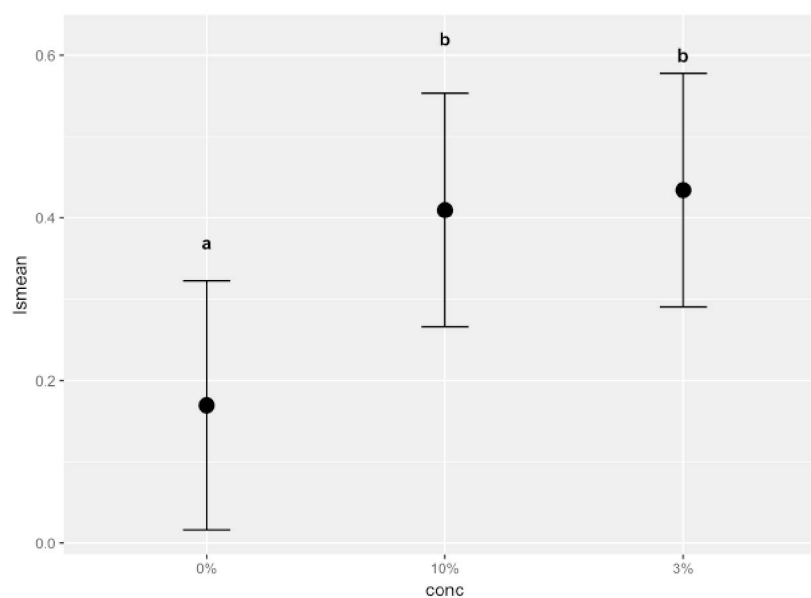
GRÁFICO 9 – RESPOSTA DA GR (GLUTATIONA REDUTASE) EM *D. parodizi* EXPOSTOS AO LIXIVIADO COLETADO NO ATERRO SANITÁRIO DA CAXIMBA, CURITIBA-PR, NOS PONTOS A (BRUTO), B (APÓS AO TRATAMENTO FÍSICO-QUÍMICO) E C (SAÍDA DA TERCEIRA WETLAND).



FONTE: O autor (2019).

LEGENDA: Letras diferentes indicam diferenças entre os pontos ($p \leq 0,05$). Os dados estão expressos como média \pm EPM (erro padrão da média).

GRÁFICO 10 – RESPOSTA DA GR (GLUTATIONA REDUTASE) EM *D. parodizi* EXPOSTOS AO LIXIVIADO COLETADO NO ATERRO SANITÁRIO DA CAXIMBA, CURITIBA-PR, NAS DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE 0% (CONTROLE), 10% E 3%.

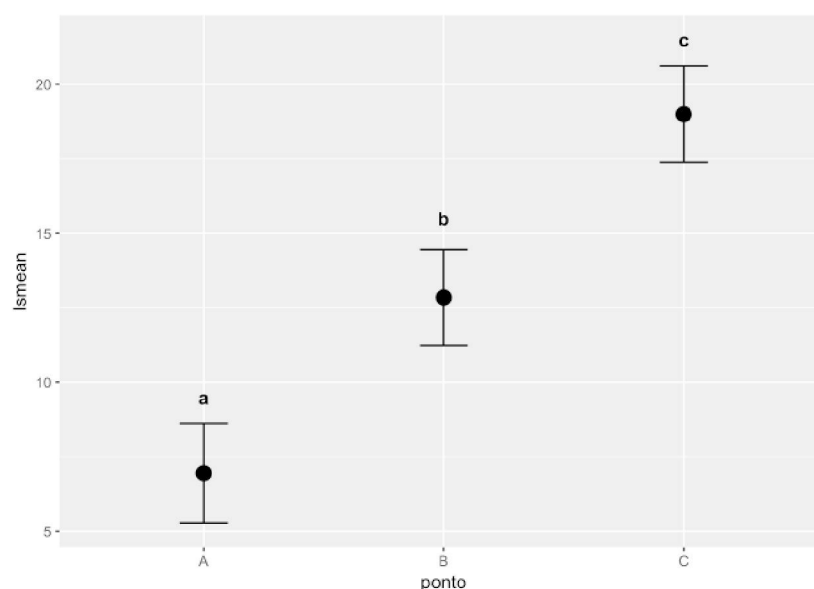


FONTE: O autor (2019).

LEGENDA: Letras diferentes indicam diferenças entre as concentrações ($p \leq 0,05$). Os dados estão expressos como média \pm EPM (erro padrão da média).

A atividade da G6PDH variou entre os pontos de coleta, sendo que no ponto A houve diminuição da atividade da G6PDH, que aumentou de forma gradual nos pontos B e C. Quando analisamos as diferenças entre as concentrações de lixiviado, as concentrações de 3% e 10% tiveram menores níveis de atividade de G6PDH em *D. parodizi*, quando comparado ao controle. Esses resultados estão representados nos Gráficos 11 e 12, para ponto de coleta e concentração de lixiviado, respectivamente.

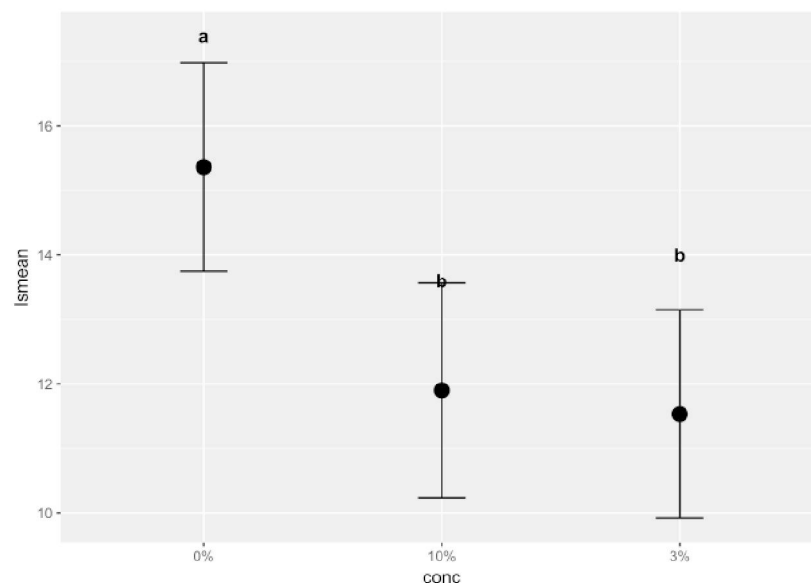
GRÁFICO 11 – RESPOSTA DA G6PDH (GLUCOSE-6-FOSFATO DESIDROGENASE) EM *D. parodizi* EXPOSTOS AO LIXIVIADO COLETADO NO ATERRO SANITÁRIO DA CAXIMBA, CURITIBA-PR, NOS PONTOS A (BRUTO), B (APÓS AO TRATAMENTO FÍSICO-QUÍMICO) E C (SAÍDA DA TERCEIRA WETLAND).



FONTE: O autor (2019).

LEGENDA: Letras diferentes indicam diferenças entre os pontos ($p \leq 0,05$). Os dados estão expressos como média \pm EPM (erro padrão da média).

GRÁFICO 12 – RESPOSTA DA G6PDH (GLUCOSE-6-FOSFATO DESIDROGENASE) EM *D. parodizi* EXPOSTOS AO LIXIVIADO COLETADO NO ATERRO SANITÁRIO DA CAXIMBA, CURITIBA-PR, NAS DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE 0% (CONTROLE), 10% E 3%.



FONTE: O autor (2019).

LEGENDA: Letras diferentes indicam diferenças entre as concentrações ($p \leq 0,05$). Os dados estão expressos como média \pm EPM (erro padrão da média).

Detalhes referentes aos valores encontrados para os outros marcadores do metabolismo celular de *D. parodizi* nos pontos de coletas (A, B e C) e concentrações de lixiviado (0%, 3% e 10%) podem ser visualizados na Tabela 7.

TABELA 7 – VALORES DA MÉDIA \pm ERRO-PADRÃO DA MÉDIA VALORES DA MÉDIA \pm ERRO-PADRÃO DA MÉDIA DO NÍVEL DOS MARCADORES DO METABOLISMO CELULAR ANALISADOS EM *D. parodizi* EXPOSTOS AO LIXIVIADO DO ATERRO SANITÁRIO DA CAXIMBA, CURITIBA-PR.

(continua)

MARCADORES	PONTO	CONCENTRAÇÕES		
		0%	3%	10%
LPO	A	25,22 \pm 16,72	15,54 \pm 4,97	9,88 \pm 0,65
	B	53,32 \pm 28,08	8,78 \pm 2,83	24,72 \pm 6,26
	C	34,52 \pm 21,42	22,82 \pm 9,94	15,31 \pm 1,44
MXR	A	23,31 \pm 2,73	24,47 \pm 1,58	21,07 \pm 1,77
	B	23,50 \pm 1,91	18,08 \pm 1,35	23,38 \pm 1,48
	C	19,33 \pm 2,40	24,72 \pm 2,93	22,39 \pm 5,58

TABELA 7 – VALORES DA MÉDIA ± ERRO-PADRÃO DA MÉDIA VALORES DA MÉDIA ± ERRO-PADRÃO DA MÉDIA DO NÍVEL DOS MARCADORES DO METABOLISMO CELULAR ANALISADOS EM *D. parodizi* EXPOSTOS AO LIXIVIADO DO ATERRO SANITÁRIO DA CAXIMBA, CURITIBA-PR.

(conclusão)

MARCADORES	PONTO	CONCENTRAÇÕES		
		0%	3%	10%
MT	A	18,58 ± 2,01	13,71 ± 2,18	15,63 ± 3,03
	B	18,35 ± 1,44	21,94 ± 1,10	20,62 ± 3,08
	C	20,39 ± 2,31	13,76 ± 1,36	16,67 ± 2,24
EROD	Aa	7 ± 0,72	7,49 ± 1,07	6,06 ± 0,75
	Bb	3,28 ± 0,37	5,02 ± 0,85	4,39 ± 0,65
	Cb	3,41 ± 0,48	3,89 ± 0,53	3,73 ± 0,65

FONTE: O autor (2019).

LEGENDA: Animais expostos a 0% (controle) e 3% e 10% de lixiviado (v/v), nos pontos A, B e C. LPO (Peroxidação lipídica), MXR (Mecanismo de resistência multixenobiótica), MT (Proteínas semelhantes a metalotioneína) e EROD (Ethoxyresorufin-O-deethylase). A LPO foi expressa em μmol s de MDA/g de tecido, MXR expressa em mM de Rodamina B/ g de tecido, MT nmol GSH/mg de proteína⁻¹ e EROD expressa em pmol resorufin.min⁻¹.mg de proteína⁻¹. Os dados estão expressos como média ± EPM (erro padrão da média). As letras diferentes nas linhas, diferenças entre os pontos (A, B e C) ($p \leq 0,05$). Interações entre ponto e concentração não são indicados na tabela.

Para os outros marcadores do metabolismo celular de *D. parodizi*, a MANOVA mostrou que a EROD respondeu de forma significativa a interação entre ponto de coleta e concentração de lixiviado e entre pontos de coleta respectivamente (Tabela 8).

TABELA 8 – RESULTADO DA ANÁLISE DE VARIÂNCIA MULTIVARIADA PARA OS EFEITOS DO PONTO, CONCENTRAÇÃO E INTERAÇÃO ENTRE PONTO E CONCENTRAÇÃO DOS MARCADORES DO METABOLISMO CELULAR ANALISADOS EM *D. parodizi* EXPOSTOS AO LIXIVIADO DO ATERRO SANITÁRIO DA CAXIMBA, CURITIBA-PR.

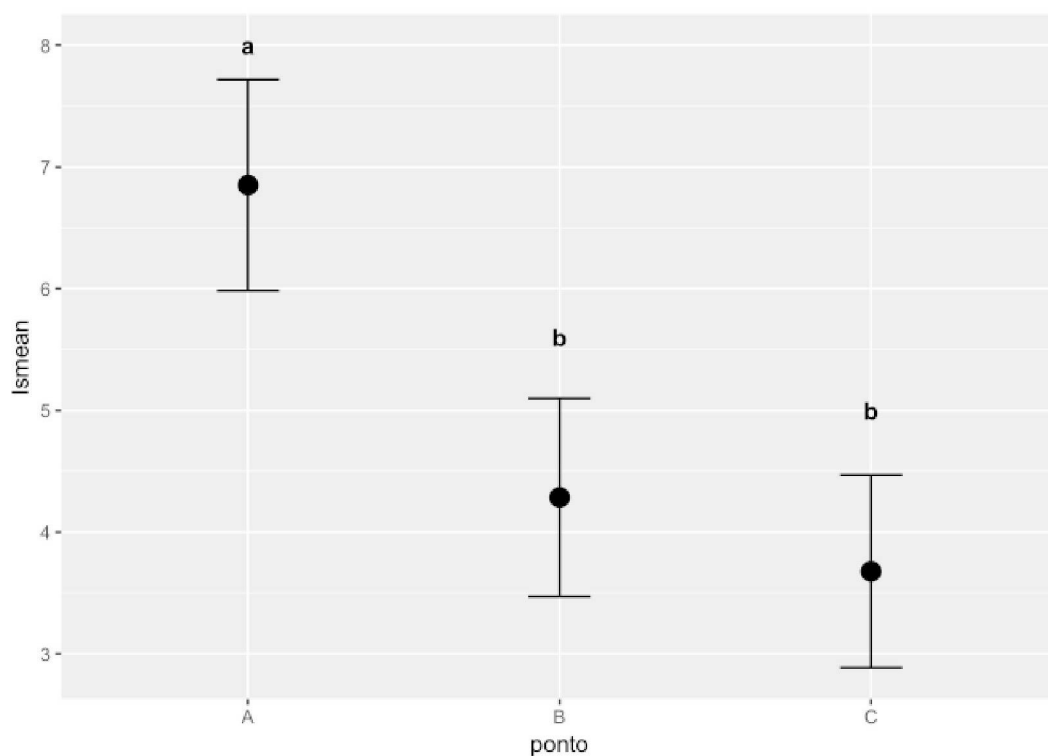
MARCADORES	PONTO		CONCENTRAÇÃO		PONTO: CONCENTRAÇÃO	
	F	P	F	P	F	P
LPO	1,2639	0,2942	1,6517	0,2052	1,4007	0,2523
MXR	0,2198	0,8037	0,0843	0,9193	1,1551	0,345
MT	2,5833	0,08807	1,0472	0,36035	1,4518	0,23495
EROD	15,4593	1,062e-05 *	1,2168	0,3069	0,5449	0,7037

FONTE: O autor (2019).

LEGENDA: Animais expostos a 0% (controle) e 3% e 10% de lixiviado (v/v), nos pontos A, B e C. LPO (Peroxidação lipídica), MXR (Mecanismo de resistência multixenobiótica), MT (Proteínas semelhantes a metalotioneína) e EROD (Ethoxyresorufin-O-deethylase). Os asteriscos indicam variação estatística significativa ($p \leq 0,05$).

A EROD apresentou os maiores níveis no ponto A quando comparado aos pontos B e C, que tiveram níveis mais baixos (GRÁFICO 13 e TABELA 7).

GRÁFICO 13 – RESPOSTA DA EROD (ETHOXYRESORUFIN-O-DEETHYLASE) EM *D. parodizi* EXPOSTOS AO LIXIVIADO COLETADO NO ATERRO SANITÁRIO DA CAXIMBA, CURITIBA-PR, NOS PONTOS A (BRUTO), B (APÓS O TRATAMENTO CONVENCIONAL) E C (SAÍDA DA TERCEIRA WETLAND).



FONTE: O autor (2019).

LEGENDA: Letras diferentes indicam diferenças entre os pontos ($p \leq 0,05$). Os dados estão expressos como média \pm EPM (erro padrão da média).

5 DISCUSSÃO

Os efeitos adversos de contaminantes em organismos aquáticos expostos a misturas complexas são de difícil compreensão. A toxicidade destes compostos é geralmente avaliada individualmente ou em misturas simples. As misturas químicas complexas podem ter efeitos aditivos, sinérgicos ou antagônicos, que serão definidos de acordo com a concentração dos compostos e como eles interagem no meio ambiente, suas rotas de absorção e eliminação dentro do organismo e também os locais de ligação envolvidos em seu modo de ação (SPURGEON et al., 2010). Nos bivalves, a brânquia representa uma ampla superfície de contato com a água circulante, tornando-se hábeis para acumular elevadas concentrações de compostos tóxicos (GREGORY et al., 1999). A capacidade destes organismos de sobreviverem em ambientes impactados é possível, dentre outros mecanismos, devido a função protetora dos tecidos que formam os filamentos branquiais (ALYAKRINSKAYA, 2003), porém essa capacidade de proteção é limitada como em qualquer organismo. Sendo assim, o objetivo desse trabalho foi avaliar o impacto de lixiviados obtidos de diferentes concentrações e pontos de tratamento nas brânquias de bivalves e verificar a eficácia do sistema de tratamento do lixiviado produzido no Aterro Sanitário da Caximba, Curitiba/PR nestes animais.

As análises dos parâmetros físico-químicos nas diferentes etapas de tratamento do lixiviado indicam redução da carga poluidora, com ponto A (lixiviado bruto) e C (saída da terceira *Wetland*) com maior e menor carga poluidora respectivamente, em todos os parâmetros químicos analisados. Os metais pesados não apresentaram diferenças entre os pontos de coleta e estão todos abaixo dos parâmetros máximos permitidos no estado do Paraná, normatizados pela CEMA nº de licença normativa 086:2013, e que cumpre os parâmetros exigidos pela legislação nacional. No Brasil, o tratamento do lixiviado ainda é rudimentar e muitos aterros ainda não cumprem a legislação vigente estabelecida pelo Conselho Nacional de Meio Ambiente CONAMA (BRASIL, 2011). Segundo o IBGE (2010), somente 531 municípios apresentavam sistema de tratamento de lixiviado interno ou externo à instalação, assim como o Aterro Sanitário da Caximba possui. A performance positiva das *wetlands* nos parâmetros físico-químicos do lixiviado do Aterro Sanitário da Caximba já foram atestadas no trabalho desenvolvido por Preussler et al., 2014. No entanto, apenas avaliações dos parâmetros físico-

químicos não são suficientes para atestar a toxicidade do lixiviado. A avaliação da qualidade de vida da biota de um ambiente aquático utilizando biomarcadores e sensíveis a xenobióticos é essencial para a compreensão dos efeitos biológicos do lixiviado em bivalves, como comprovado pelos resultados obtidos neste trabalho.

O uso dos biomarcadores para a investigação de misturas complexas é interessante porque podem atuar como parâmetros de monitorização ou análise do resultado do tratamento de um efluente (TSARPALI e DAILIANIS, 2012). Existem diferentes tipos de biomarcadores, os de exposição, efeito e susceptibilidade. Os parâmetros avaliados no presente estudo são biomarcadores de efeito pois são alterações bioquímicas precoces e reversíveis que podem ser mensuradas em amostras biológicas.

O Mecanismo de resistência multixenobiótica (MXR), é caracterizado por uma proteína transportadora de membrana que desempenha um mecanismo de ação primária essencial na defesa celular contra xenobióticos (KURELEC et al., 2000), onde uma menor atividade do MXR pode conduzir ao acúmulo de xenobióticos nas células. É considerado uma defesa importante dos organismos aquáticos, pois contribui para reduzir a acumulação de xenobióticos no interior das células. Este mecanismo depende da atividade das glicoproteínas P (P-gp), que são ATP-dependentes e transportam uma variedade de substratos com diferentes estruturas e funções para fora da célula. Os compostos que interagem com este mecanismo são geralmente produtos moderadamente hidrofóbicos, planos ou naturais (BARD, 2000). O MXR não apresentou diferenças significativas entre os pontos ou concentrações para ambas as espécies. Para *C. fluminea*, os resultados encontrados para o MXR, são diferentes dos de Oliveira et al., (2014; 2016), que observaram respostas variáveis do MXR para a espécie, sendo tempo-dependentes, com aumento do MXR em maiores concentrações de lixiviado, quando comparado aos controles. No presente estudo, o MXR pode não estar sendo ativado. O lixiviado é uma mistura complexa, com grande variação em sua composição que depende do tipo de resíduo que é descartado no aterro e que pode originar respostas variáveis para a mesma espécie que possuem habitats distintos, onde certos compostos podem agir de forma antagônica, inibindo a atividade do MXR e em outros induzindo. Outro fator que pode ser considerado é o tempo de exposição dos animais ao lixiviado, Pain et al. (2007) observaram em bivalves dulcícolas *Dresina polymorpha*, que a atividade de MXR foi reduzida para o seu nível de base após um

período de oito a nove dias ($13,1 \pm 3,1$; $7 \pm 2,6$; $13,7 \pm 3,9$ pmol RB min⁻¹) org⁻¹) após três experimentos de depurações laboratoriais).

As proteínas semelhantes à metalotioneína (MT) neste trabalho não responderam aos diferentes tratamentos (pontos de coletas e concentrações) em brânquias de *D. parodizi* expostas ao lixiviado, resultado corroborado pelas análises de metais feitas no lixiviado que indicam que os níveis de metais se encontram dentro do exigido pela legislação Brasileira e que seriam seguros para os organismos. As MTs, que tem função protetora contra estresse oxidativo e potencializadas na presença de metais, são proteínas de baixo peso molecular, ricas em cisteínas e são, portanto, consideradas ligantes metálicos (AMIARD et al., 2006). A regulação de biossíntese de MT por metais é considerada uma resposta biológica para manter concentrações homeostáticas de íons metálicos essenciais e não essenciais por processo de quelação (FILIPOVI e RASPOR, 2003). Tsarpali e Dailianis (2012) observaram um aumento no teor de MT nos tecidos de *M. galloprovincialis* expostos a um lixiviado de aterro, mas esse aumento ocorreu em concentrações (0,01 e 0,1 por cento v/v) e após exposição de 96 h. Estes autores observaram o mesmo aumento na lipoperoxidação (LPO).

O radical hidroxila (OH⁻) é formado a partir do peróxido de hidrogênio (H₂O₂) pela reação de Fenton, catalisada por íons ferro (Fe⁺⁺) ou cobre (Cu⁺⁺). Este radical é o mais reativo e nocivo dentre as EROs para o sistema biológico, sendo capaz de reagir rapidamente com as biomoléculas, desencadeando a peroxidação dos lipídeos (LPO) através da retirada de um átomo de hidrogênio dos ácidos graxos poliinsaturados (polyunsaturated fatty acids- PUFAs) da membrana celular (NORDBERG e ARNÉR, 2001, ANDRADE et al., 2010; Barbosa et al., 2010; OLIVEIRA e SCHOFFEN, 2010). A LPO pode gerar alterações estruturais e funcionais nas membranas celulares e em condições extremas de estresse oxidativo, a morte celular, sendo um importante biomarcador de dano oxidativo. A LPO inicia-se com a retirada de prótons H⁺ do grupo metileno dos fosfolipídios pelos radicais livres, com posterior produção de dienos conjugados e formação de hidroperóxidos lipídicos. Com a participação de metais catalíticos (ferro e cobre) há degradação dos hidroperóxidos e formação de outras espécies reativas mais deletérias à célula, como o radical alcóxil (RO⁻) e peróxil (ROO⁻) (BARREIROS et al., 2006). No presente trabalho a LPO, assim como a MT, em *D. parodizi* não variou entre os pontos de coleta do lixiviado ou concentrações. No trabalho desenvolvido

por Oliveira et al., (2014) o aumento do conteúdo de MT somente foi observado após 15 dias de exposição à menor concentração de lixiviados e os autores sugerem que isso pode ter contribuído para não ocorrer LPO nas células de *C. fluminea* nesse período experimental. Resultados que mostram essa relação entre MT e LPO, foram relatados em bivalves de água salgada *Ruditapes decussatus* (GERET et al., 2003) e *Crassostrea gigas* (DAMIENS et al., 2006). As alterações ocorridas nas enzimas antioxidantes analisadas indicam que houve mudanças no estado oxidante devido à variação da concentração de EROs influenciadas pela presença de diferentes concentrações de lixiviado em diferentes condições de tratamento, porém a ausência de dano em lipídeos celulares por peroxidação lipídica, efeito presente em ambientes com aumento de EROS, indicam que as enzimas antioxidantes, assim como outros elementos da defesa antioxidante não analisadas parecem ter sido eficientes no controle da concentração de espécies reativas de oxigênio, impedindo grandes efeitos de danos pela presença de peroxidação lipídica.

As enzimas glutathione S-transferases possuem um papel fundamental em mecanismos de detoxificação intracelular tanto de compostos xenobióticos como endobióticos (DULHUNTY, 2001). As GSTs pertencem a uma família multifuncional de enzimas que catalisam a conjugação da GSH a várias outras moléculas (HAYES e McLELLAN, 1999). Para *C. fluminea* foi possível observar que o lixiviado do ponto A, bruto, e por tanto com a maior carga poluidora, estimulou de maneira mais intensa a atividade enzimática da GST quando comparado com os lixiviados dos pontos B e C. O aumento da enzima de biotransformação de fase II, GST, também foi evidenciado em trabalhos realizados com brânquias de *C. fluminea* expostos a lixiviados em concentrações mais altas (OLIVEIRA et al., 2016) e em brânquias de caracóis de água doce, *Bellamya purificata*, expostos a 1,5 e 10% de lixiviação durante um período de 2, 7 e 15 dias (LI et al., 2008). Estudos de campo envolvendo o bivalve marinho, *Mya arenaria*, também encontraram maior atividade de GST nos locais mais poluídos sob a influência de misturas de contaminantes, como o esgoto municipal (GAGNÉ et al. 2009). Oliveira et al. (2014) evidenciaram alta atividade de GST em brânquias de *C. fluminea* expostas ao lixiviado de aterro por 5 dias nas concentrações mais altas de 6% e 10%, sendo que a EROD aumentou na glândula digestiva após 15 dias, também nas maiores concentrações de lixiviado testadas no trabalho.

Para *D. parodizi*, o maior nível de GST foi observado no ponto B, após o tratamento físico-químico, e nas concentrações de 3% e 10%. Isso sugere que as cargas mais altas de lixiviado e de poluentes induzem as respostas de GST em ambas as espécies. Nesse mesmo ponto também se detectaram os maiores níveis de atividade da enzima GR indicando que a GST está sendo suprida com o seu substrato GSH.

Os baixos níveis da GST de *D. parodizi* foram observadas no ponto A, esse resultado pode ser explicado se considerarmos um possível efeito hormético (CALABRESE, 2002; 2005), no qual ocorre o fenômeno de baixa dose de inibição e alta dose de estimulação (ou baixa dose de estimulação e alta dose de inibição) e que pode ser frequentemente encontrado em estudos toxicológicos sobre produtos químicos orgânicos tóxicos (VOM SAAL et al., 1997; WETHERILL et al. al., 2002). Para moluscos, o fenômeno de hormese foi relatado em hemócitos dos mexilhões *Mytilus galloprovincialis* expostos a tris (1-cloro-2-propil) fosfato (TCPP) (WU et al., 2018) e em *Ruditapes philippinarum* expostos a benzo (a) pireno (BaP) (0,02 e 0,2µM) (ZHANG et al., 2011).

A atividade enzimática de G6PDH favorece a manutenção do potencial redox, essencial para a manutenção dos níveis celulares de glutathiona reduzida. A enzima G6PDH é a fonte principal da síntese de NADPH, cofator essencial para a produção celular de GSH. A exposição do bivalve *D. parodizi* aos lixiviados dos diferentes pontos demonstrou que quanto maior a carga poluidora do lixiviado, menor é atividade enzimática da G6PDH, o mesmo sendo observado com o aumento das concentrações. Sáenz et al. (2010) relataram que a exposição ao esgoto urbano não foi capaz de aumentar os níveis de G6PDH nas brânquias do bivalve *Perna*. A atividade da G6PDH nas brânquias de *C. fluminea* não se alterou em resposta aos diferentes pontos de coletas e concentrações de lixiviado demonstrando um diferente padrão de resposta entre as duas espécies de bivalves analisados.

Os níveis de atividade da EROD nas brânquias de *D. parodizi* variaram nos diferentes tratamentos, sendo maior no ponto A (lixiviado bruto) e menor no ponto C (saída da terceira *Wetland*), sugerindo a presença de hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (PAHs) e bifenilos policlorados (PCBs) no lixiviado (LEMAIRE e LIVINGSTONE, 1993; GOWLAND et al., 2002; BINELLI et al., 2006; FARIA et al., 2009). A ativação da EROD indica indução enzimática da CYP1A, sugerindo o

aumento na produção de espécies reativas de oxigênio (EROs), dentre eles, o radical superóxido (O_2^-), corroborado pelo comportamento da SOD que foi similar ao da EROD. Neste trabalho, quando analisamos a atividade da SOD em brânquias de *D. parodizi* exposto ao lixiviado nos diferentes pontos de coletas, podemos inferir, indiretamente, que houve aumento na produção de EROs e consequentemente estresse oxidativo. A GPx pode ter removido os níveis elevados de peróxidos formados, já que seguiu o mesmo padrão de atividade da SOD, ou seja, foi maior no ponto A e diminuiu gradualmente nos pontos B e C, respectivamente, compatível com a carga poluidora dos lixiviados.

Porém, nas brânquias de *C. fluminea* expostas ao lixiviado, a SOD respondeu de forma diferente, com menor atividade ocorrendo no ponto A (lixiviado bruto) e maiores nos pontos B (após tratamento físico-químico) e C (saída da terceira *Wetland*). Os pontos de coletas e as concentrações de lixiviado não alteraram a atividade da GPx. As diferenças nas respostas entre as duas espécies, pode indicar que para *C. fluminea* os componentes do lixiviado foram capazes de inibir a atividade da SOD, comprometendo assim a capacidade do organismo se defender contra o radical superóxido deixando as células mais expostas aos danos, já *D. parodizi* apresentou uma defesa eficiente em proteger as células dos danos promovidos pelo lixiviado aumentando a SOD e a GPx. No ponto C (saída da terceira *Wetland*), nas brânquias de *D. parodizi*, a SOD, GR, GST e GPx, tiveram seus níveis mais reduzidos, reforçando a eficiência do tratamento complementar das *wetlands*. No entanto, a SOD e a GST responderam aos tratamentos para as duas espécies, o que mostra que esses marcadores foram mais sensíveis ao lixiviado dos diferentes pontos e tratamentos.

Assim, todos os componentes de lixiviação devem ser considerados potencialmente promotores das alterações no metabolismo celular observadas em *D. parodizi* e *C. fluminea*, mesmo em um tempo relativamente curto de exposição. Isso ressalta os efeitos negativos e potencialmente letais para as populações de bivalves sujeitos a contaminação de corpos hídricos com lixiviado, tanto de aterros sanitários quanto de lixões, a curto e médio prazo, tornando fundamental o conhecimento dos efeitos biológicos dos poluentes como os presentes em lixiviados em animais, além dos parâmetros físico-químico.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Tanto a espécie nativa, *D. parodizi*, quanto a exótica *C. fluminea*, quando submetidas ao lixiviado apresentaram diferentes respostas fisiológicas aferidas através de biomarcadores bioquímicos. No presente estudo não podemos comparar as duas espécies, mesmo que pertencentes a grupos taxonômicos próximos, pois poucos biomarcadores podem ser comparados, dificultando a indicação de uma espécie bioindicadora. Porém, a espécie *D. parodizi* se mostrou mais sensível ao lixiviado, com resposta de todas as enzimas do sistema oxidativo, enquanto *C. fluminea* respondeu apenas com alterações na SOD e GST, sendo que essas enzimas se mostraram sensíveis em ambas as espécies nos diferentes tratamentos.

As atividades enzimáticas do sistema de defesas antioxidantes foram mais sensíveis ao lixiviado dos diferentes tratamentos e concentrações, sendo melhores biomarcadores do que os marcadores MT, MXR e LPO, que não responderam de forma tão eficaz aos tratamentos utilizados no presente estudo. Porém, se as enzimas antioxidantes sofreram alterações, isso indica que houve surgimento de ambiente oxidante, mas sem alteração da LPO, indicando que as defesas antioxidantes foram suficientes para impedir o dano. Os marcadores de defesa do sistema antioxidantes foram eficientes para demonstrar variação ambiental.

O Aterro Sanitário da Caximba está desativado desde 2010, provavelmente o lixiviado presente no Aterro é antigo, e por ser uma mistura complexa, com a ação do tempo, muitas substâncias poluidoras/tóxicas que o compõem podem ter sido degradadas. Além disso, o experimento que realizamos foi de curto prazo (7 dias) e este tempo pode não ter sido capaz de causar dano celular detectável, mas que em uma exposição de médio a longo prazo, esses efeitos podem vir a ser observados.

Os resultados obtidos nesse trabalho mostram a eficácia do tratamento empregado pelo Aterro Sanitário da Caximba quando observamos as respostas, no geral positivas quando comparada entre os pontos, dos marcadores usados para ambas as espécies, porém, com o foco maior na espécie nativa que teve seu metabolismo celular mais explorado, onde usamos um maior número de biomarcadores, foi possível compreender melhor os danos causados a espécie. Entretanto é fundamental apontar que ambos os animais se mostraram sensíveis aos contaminantes presentes no lixiviado.

REFERÊNCIAS

- ABBAS, A. A.; JINGSONG, G.; PING, L. Z.; YA, P. Y.; AL-REKABI, W. S. Review on Landfill Leachate Treatments. **American Journal of Applied Sciences**, v. 6, n. 4, p. 672-684, 2009.
- ALYAKRINSKAYA, I. O. Tissue Hemoglobins in Bivalvia (Mollusca). **Biological Bulletin**, v. 30, n. 6, p. 617-626, 2003.
- AMIARD, J.C.; AMIARD-TRIQUET, C.; BARKA, S.; PELLERIN, J.; RAINBOW, P.S. Metallothioneins in aquatic invertebrates: their role in metal detoxification and their use as biomarkers. **Aquatic Toxicology**, v. 76, n. 2, p. 160-202, 2006.
- ANDRADE, E. R.; MELO-STERZA, F. A.; SENEDA, M. M.; ALFIERI, A. A. Consequências da produção das espécies reativas de oxigênio na reprodução e principais mecanismos antioxidantes. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.34, n.2, p. 79-85, 2010.
- APHA. **American Public Health Association**. Standard methods for the examination of water and wastewater, 21st ed. Washington, 2005.
- ATTA, M.; YAACOB, W. Z. W. The potential impact of leachate-contaminated groundwater of an ex-landfill site at Taman Beringin Kuala Lumpur. **Environmental Earth Sciences**, v. 73, p. 3913-3923, 2015.
- BARBOSA, K.B.F.; COSTA, N.M.B.; ALFENAS, R.C.G.; DE PAULA, S.O.; MINIM, V.P.R.; BRESSAN, J. Estresse oxidativo: conceito, implicações e fatores modulatórios. **Revista de Nutrição**, v.23, n.4, p.629-643, 2010.
- BARD, S.M. Multixenobiotic resistance as a cellular defense mechanism in aquatic organisms. **Aquatic Toxicology**, v. 48, n. 4, p. 357–389, 2000.
- BARREIROS, A. L. B. S.; DAVID, J. M.; DAVID, J. P. Estresse oxidativo: Relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. **Química Nova**, v. 29, p. 113-123, 2006.
- BINELLI, A.; RICCIARDI, F.; RIVA, C.; PROVINI, A. New evidences for old biomarkers: effects of several xenobiotics on EROD and AChE activities in Zebra mussel (*Dreissena polymorpha*). **Chemosphere**, v. 62, p. 510–519, 2006.
- BONETTO, A. Investigaciones acerca de las formas larvales en el género Diplodon y su aplicación a los estudios sistemáticos. **Dirección de Recursos Naturales, Ministerio de Agricultura y Ganadería**, Santa Fé, p. 48, 1962.
- BURKE, M. D.; THOMPSON, S.; ELCOMBE, C. R.; HALPERT, J.; HAAPARANTA, T.; MAYER, R. T. Ethoxy-, pentoxy- and benzyloxyphenoxazones and homologues: a series of substrates to distinguish between different induced cytochromes P-450. **Biochemical Pharmacology**, Nova York, v. 34, n. 18, p. 3337-3345, 1985.

BRASIL. CONAMA. Resolução n. 430, de 13 de maio de 2011. Dispõe sobre as condições e padrões de lançamento de efluentes, complementa e altera a Resolução no 357, de 17 de março de 2005, do CONAMA. **Diário Oficial da União: República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, n. 92, 16 maio 2011. p. 89.

BRUSCA, R. C.; G. J. BRUSCA. **Invertebrados**. 2a Ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 968, 2007.

CALABRESE, E. J. Hormesis: changing view of the dose-response, a personal account of the history and current status. **Mutation Research**, v. 511, n. 3, p. 181-189, 2002.

CALABRESE, E. J. Paradigm lost, paradigm found: The re-emergence of hormesis as a fundamental dose response model in the toxicological sciences. **Environmental Pollution**, Barking, v. 138, n. 3, p. 378-411, 2005.

CANEPARO, S. G; PASSOS, E; MURATORI, A. M. Avaliação da fragilidade ambiental na represa do rio verde Araucária– Região Metropolitana de Curitiba – Paraná – Brasil. **Revista Geonorte**, v.2, n.4, p.216 – 228, 2012.

CARLBERG, I.; MANNERVIK, B. Purification and characterization of the flavoenzyme glutathione reductase from rat liver. **Journal of Biological Chemistry**, v. 250, p. 5475–5480, 1975.

CAZENAVE, J.; BACCHETTA, C.; PARMA, M. J.; SCARABOTTI, P. A.; WUNDERLIN, D. A. Multiple biomarkers responses in *Prochilodus lineatus* allowed assessing changes in the water quality of Salado River basin (Santa Fe, Argentina). **Environmental Pollution**, v. 157, p. 3025–3033, 2009.

CIARDELLO, M.; CAMARDELLA, L.; DI PRISCO, G. Glucose-6-phosphate dehydrogenase from the blood cells of two Antarctic teleosts: correlation with cold adaptation. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1250, p. 76–82, 1995.

CROOKS, J. A. Characterizing ecosystem-level consequences of biological invasions: the role of ecosystem engineers. **Oikos Journal**, v. 97, p. 153-166, 2002.

CROUCH, R.K.; GANDY, S.C.; KINSEY, G. The inhibition of islet superoxide dismutase by diabetogenic drugs. **Diabetes**, v.30, p.235-241, 1981.

DAMIENS, G.; MOUNEYRAC, C.; QUINIOU, F.; HIS, E.; GNASSIA-BARELLI, M.; ROMEÓ, M. Metal bioaccumulation and metallothionein concentrations in larvae of *Crassostrea gigas*. **Environmental Pollution**, v.140, p. 492–499, 2006.

DARRIGAN, G. A. Invasores en la Cuenca del Plata. **Ciencia Hoy**, v. 7, n. 38, p. 17-22, 1997.

DEPLEDGE, M. H.; AAGAARD, A.; GYÖRKÖS, P. Assessment of trace metal toxicity using molecular, physiological and behavioural biomarkers. **Marine Pollution Bulletin**, v. 31, n. 1-3, p. 19-27, 1995.

DI BELLA, G.; DI TRAPANI, D.; MANNINA G.; VIVIANI G. Modeling of perched leachate zone formation in municipal solid waste landfills. **Waste Management**, v. 32, n. 3, p. 456-462, 2012.

DULHUNTY, A.; GAGE, P.; CURTIS, S.; CHELVANAYAGAM, G.; BOARD, P. The glutathione transferase structural family includes a nuclear chloride channel and a ryanodine receptor calcium release channel modulator. **Journal of Biological Chemistry**, v. 276, n. 5, p. 3319-23, 2001.

EGGENS, M. L.; GALGANI, F. Ethoxyresorufin -O- deethylase (EROD) activity in flatfish: fast determination with a fluorescence plate-reader. **Marine Environmental Research**, v. 33, p. 213, 1992.

FARIA, M.; CARRASCO, L.; DIEZ, S.; RIVA, M.C.; BAYONA, J.M.; BARATA, C. Multibiomarker responses in the freshwater mussel *Dreissena polymorpha* exposed to polychlorobiphenyls and metals. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, v.149, p. 281–288, 2009.

FEDATO, R. P.; SIMONATO, J. D.; MARTINEZ, C. B. R.; SOFIA, S. H. Genetic damage in the bivalve mollusk *Corbicula fluminea* induced by the water soluble fraction of gasoline. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 700, p. 80–85, 2010.

FEDERICI, G.; SHAW, B. J.; HANDY, R. D. Toxicity of titanium dioxide nanoparticles to rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): gill injury, oxidative stress, and other physiological effects. **Aquatic Toxicology**, v. 84, p. 415–430, 2007.

FILIPOVI, V.; RASPOR B. Metallothionein and metal levels in cytosol of liver, kidney and brain in relation to growth parameters of *Mullus surmuletus* and *Liza aurata* from the Eastern Adriatic Sea. **Water Research**, v. 37, n.13, p. 3253-3262, 2003.

FOX, J. S.; WEISBERG, S. **An R companion to applied regression**, 2nd edn. Sage Publications, California, 2011.

GAGNÉ, F.; BLAISE, C.; PALLERIN, J.; FOURNIER, M.; GAGNON, C.; SHERRY, J.; TALBOT A. Impacts of pollution in feral *Mya arenaria* populations: the effects of clam bed distance from the shore. **Sci Total Environ**, v. 407, n. 22, p. 5844–5854, 2009.

GERET, F.; SERAFIM, A.; BEBIANNO, M. Antioxidant enzyme activities, metallothionein and lipid peroxidation as biomarkers in *Ruditapes decussatus*?. **Ecotoxicology**, v.12, p. 417–426, 2003

GOLDBERG, E. D. The mussel watch: a first step in global marine monitoring. **Marine Pollution Bulletin**, v. n. 7, p. 111–132, 1975.

GOWLAND, B.T.G.; MCINTOSH, A.D.; DAVIES, I.M.; MOFFAT, C.F.; WEBSTER, L. Implications from field study regarding the relationship between polycyclic aromatic hydrocarbons and glutathione S-transferase activity in mussels. **Marine Environmental Research**, v. 54, p. 231–235, 2002.

GREGORY, M. A.; GEORGE, R. C.; MARSHALL, D. J.; ANANDRAJ A.; MCCLURG T. P. The effects of mercury exposure on the surface morphology of gill filaments in *Perna perna* (Mollusca: Bivalvia). **Marine Pollution Bulletin**, v. 39, p. 116-121, 1999.

HAYES, J. D.; MCLELLAN, L. I. Glutathione and glutathione-dependent enzymes represent a co-ordinately regulated defence against oxidative stress. **Free Radical Research**, v. 31, n. 4, p. 273-300, 1999.

HENRY, R.; SIMÃO, C. A. Evaluation of density and biomass of a bivalve population (*Diplodon delontus expansus*) (Küster, 1856) in a small tropical reservoir. **Revista Hydrobiologia Tropical**, v. 17, n. 4, p. 309-318, 1984.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Pesquisa Nacional de Saneamento Básico**. Rio de Janeiro. ISBN 978-85-240-4135-8 (meio impresso), 2010.

JONES, D. L.; WILLIAMSON, K. L.; OWEN, A. G. Phytoremediation of landfill leachate. **Waste Management**, v. 26, p. 825-837, 2006.

KEEN, J. H.; HABIG, W. H.; JAKOBI, W. B. Mechanism for the several activities of the glutathione-S-transferase. **Journal of Biology Chemistry**, v. 251, p. 6183-6188, 1976.

KJELDSSEN, P.; BARLAZ, M. A.; ROOKER, A. P. Present and long term composition of MSW landfill leachate: a review. **Critical Reviews in Environmental Science and Technology**, v. 32, n. 4, p. 297-336, 2002.

KURELEC, B.; SMITAL, T.; PIVEEVIAE, B.; EUFEMIA, N.; EPEL, D. Multixenobiotic resistance, P-glycoprotein and Chemosensitizers. **Ecotoxicology**, v. 9, p. 307-327, 2000.

LEMAIRE, P.; LIVINGSTONE, D.R. Pro-oxidant/antioxidant processes and organic xenobiotic interactions in marine organisms, in particular the flounder *Platichthys flesus* and the mussel *Mytilus edulis*. **Trends in Comparative Physiology**, v.1, p. 1119 - 1150, 1993.

LENTH R. V. Least-Squares Means: The R Package lsmeans. **Journal of Statistical Software**, v. 69, n. 1, p. 1-33, 2016.

LI X.; LIN L.; LUAN T.; YANG L.; LAN C. Effects of landfill leachate effluent and bisphenol A in glutathione and glutathione-related enzymes in the gills and digestive glands of the freshwater snail *Bellamya purificata*. **Chemosphere**, v. 70, p. 1903-1909, 2008.

LONG, S.; SVENDSEN, C.; SHORE, R.; OSBORN D.; POTTINGER, T.; ALLEN., Y.; THOMAS, K.; CHIPMAN, K. Evaluation of Potential Use of Biomarkers as Long-term Monitoring Tools in Assessing Ecological Quality in Terrestrial and Aquatic Environments of the UK, 593. **English Nature Report**, 26, 2004.

MACHADO, A. B. M.; DRUMMOND, G. M.; PAGLIA, A. P. **Livro vermelho da fauna brasileira ameaçada de extinção**. 1, 510. Brasília: Ministério do Meio Ambiente, 2008.

MARTELETO, P. B.; LOMÔNACO, C.; KERR, W. E. Resposta fisiológicas, morfológicas e comportamentais de *Zabrotes subsciatus* (Boheman) (Coleoptera: Bruchidae) associados ao consumo diferentes variedades de feijão (*Phaseolus vulgaris*). **Neotropical Entomology**, vol.38, n.2, p.178-185, 2009.

MATEJCZYK M.; PŁAZA G. A.; NAŁĘCZ-JAWECKI G.; ULFIG K.; MARKOWSKA-SZCZUPAK A. Estimation of the environmental risk posed by landfills using chemical, microbiological and ecotoxicological testing of leachates. **Chemosphere**, v. 82, p. 1017–1023, 2011.

MEDEIROS, D. R. M.; LUDKA, V.; PASSOS, E.; CAPENARO, S. C. **Uso e ocupação do solo da nova sede do município de Campo Magro – PR**. Disponível em: <<http://www.anppas.org.br/encontro5/cd/artigos/GT14--837-2010090303190110.pdf>> Acessado em: 20/06/2018), 2011.

MEYER A. N.; OLIVEIRA E.; SILVA I.; PRESTES J. P. Evaluation of density of freshwater bivalves from the Environmental Protection Area (APA) of Verde River, Campo Magro, Paraná, Brazil. **Pan-American Journal of Aquatic Sciences**, v. 12, n. 1, p. 21-30, 2017.

MORTON, B. The population dynamics of *Corbicula fluminea* (Bivalvia: Corbiculacea) in Plover Cove Reservoir, Hong Kong. **Journal of Zoology**, London. v.181, p. 21-42, 1977.

NETO, P. S.; SILVA J. R. A.; MACEDO, L. F. F.; RAMOS F. F.; KLEMMANN L. J. Composição e distribuição da avifauna na área do aterro sanitário da Caximba, Região Metropolitana de Curitiba. **Atualidades Ornitológicas**, nº 168, 2012.

NORDBERG, J.; ARNÉR, E.S.J. Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system. **Free Radical Biology and Medicine**, v.31, n.11, p.1287-1312, 2001.

O'CONNOR, T. P. National distribution of chemical concentrations in mussels and oysters in the USA. Mar. **Environmental Research**, v.53, p.117–143, 2002.

OLIVEIRA, L. F.; SANTOS, C.; MARTINEZ, C. B. R. Biomarkers in the freshwater bivalve *Corbicula fluminea* confined downstream a domestic landfill leachate discharge. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 23, n. 14, p. 13931–13942, 2016.

OLIVEIRA, L. F.; SILVA, S. M. C. P.; MARTINEZ, C. B. R. Assessment of domestic landfill leachate toxicity to the Asian clam *Corbicula fluminea* via biomarkers. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 103, p. 17–23, 2014.

OLIVEIRA, M. C.; SCHOFFEN, J. P. F. Oxidative stress action in cellular aging. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 53, n. 6, p. 1333-1342, 2010.

OMAN, C. B.; JUNESTEDT, C. Chemical characterization of landfill leachates 400 parameters and compounds. **Waste Management**, v. 28, p. 1876-1891, 2008.

PAIN, S.; PARANT, M. Identification of multixenobiotic defence mechanism (MXR) background activities in the freshwater bivalve *Dreissena polymorpha* as reference values for its use as biomarker in contaminated ecosystems. **Chemosphere**, v.67, p.1258-1263, 2007.

PELTIER, G.L.; MEYER J. L.; JAGOE C. H.; HOPKINS W. A. Using trace element concentrations in *Corbicula fluminea* to identify potential sources of contamination in an urban river. **Environmental Pollution**, v. 154, p. 283– 290, 2008.

PEREIRA, D.; MANSUR, M. C. D.; OLIVEIRA, A. S. Bivalve distribution in hydrographic regions in South America: historical overview and conservation. **Hydrobiologia**, v. 735, p. 15–44, 2013.

PRATHER, C. M.; PELINI, S. L.; LAWS, A.; RIVEST, E.; WOLTZ, M.; BLOCH, C. P.; DEL TORO, I.; HO, C. K.; KOMINOSKI, J.; NEWBOLD, T. A.; PARSONS, S.; JOERN, A. Invertebrates, ecosystem services and climate change. **Biological Reviews**, v. 88, n. 2, p. 327-348, 2012.

PREUSSLER, K. H.; MAHLER, C. F.; MARANHO, L. T. Performance of a system of natural wetlands in leachate of a posttreatment landfill. *International Journal of Environmental Science and Technology*, v. 12, n. 8, p. 2623–2638, 2015.

R CORE TEAM (2017). R: A language and environment for statistical computing. **R Foundation for Statistical Computing**, Vienna, Austria. URL <https://www.R-project.org/>.

RODRIGUES V. G. S.; FUJIKAWA A.; ABESSA D. M. S.; HORTELLANI M. A.; SARKIS J. E. S.; SÍGOLO J. B. Uso do bivalve límico *Anodontites tenebricosus* (LEA, 1834) no biomonitoramento de metais do Rio Ribeira de Iguape. **Química Nova**, v. 35, n. 3, p. 454-459, 2012.

SÁENZ L. A.; SEIBERT E. L.; ZANETTE J.; FIEDLER H. D.; CURTIUS A. J.; FERREIRA J. F.; ALMEIDA E. A.; MARQUES M. R. F.; BAINY A. C. D. Biochemical biomarkers and metals in Perna mussels from mariculture zones os Santa Catarina, Brazil. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 73, p.796– 804, 2010.

SANTOS, K. C.; MARTINEZ, C. B. R. Genotoxic and biochemical effects of atrazine and Roundups, alone and in combination, on the Asian clam *Corbicula fluminea*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 100, p. 7–14, 2014.

SIMONE, L. R. L. Land and freshwater mollusks of Brazil. **EGB, FAPESP**, São Paulo, p. 390, 2006.

SPURGEON D. J.; JONES O. A. H.; DORNE J. C. M.; SVENDSEN C.; SWAIN S.; STURZENBAUM S. R. Systems toxicology approaches for understanding the joint

effects of environmental chemical mixtures. **Science of the Total Environment**, v. 408, p.3725–3734, 2010.

TSARPALI, V.; DAILIANIS, S. Investigation of landfill leachate toxic potency: an integrated approach with the use of stress in dices in tissues of mussels. **Aquatic Toxicology**, v. 124–125, p. 58–65, 2012.

TSARPALI, V.; KAMILARI, M.; DAILIANIS, S. Seasonal alterations of landfill leachate composition and toxic potency in semi-arid regions. **Journal of Hazardous Materials**, v. 233–234, p. 163-171, 2012.

VAUGHN, C. C.; HAKENKAMP, C. C. The Functional role of burrowing bivalves in freshwater ecosystems. **Freshwater Biology**, v. 46, v. 1431-1446, 2001.

VIARENGO, A.; PONZANO, E.; DONDERO, F.; FABBRI, R. A simple spectrophotometric method for metallothionein evaluation in marine organisms: Application to mediterranean and antartic molluscs. **Marine Environmental Research**, v. 44, p. 69-84, 1997.

VIDIGAL, T. H. D. A.; MARQUES, M. M. G. S. M.; LIMA, H. P.; BARBOSA, F. A. R. Gastrópodes e bivalves límnicos do trecho médio da bacia do Rio Doce, Minas Gerais, Brasil. **Lundiana**, v. 6, p. 67-76, 2005.

VIEIRA, C. E. D.; COSTA, P. G.; LUNARDELLI, B.; OLIVEIRA, L. F.; DA COSTA CABRERA, L.; RISSO, W. E.; PRIMEL, E. G.; MELETTI, P. C.; FILLMANN, G.; MARTINEZ C. B. Multiple biomarker responses in *Prochilodus lineatus* subjected to short-term in situ exposure to streams from agricultural areas in Southern Brazil. **Science of The Total Environment**, v. 542, p. 44–56, 2016.

VOM SAAL, F.S.; TIMMS, B.G.; MONTANO, M.M.; PALANZA, P.; THAYER, K.A.; NAGEL, S.C.; DHAR M. D.; GANJAM V. K.; PARMIGIANI S.; WELSHONS W. V. Prostate enlargement in mice due to fetal exposure to low doses of estradiol or diethylstilbestrol and opposite effects at high doses. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 94, p. 2056–2061, 1997.

WANG, Z. S.; YAN C. Z.; YAN Y. J.; CHI Q. Q. Integrated assessment of biomarker responses in caged shrimps (*Litopenaeus vannamei*) exposed to complex contaminants from the Maluan Bay of China. **Ecotoxicology**, v. 21, p. 869–881, 2012.

WENDEL, A. Glutathione peroxidase. **Methods in Enzymology**, v. 77, p. 325-332, 1981.

WERNERSSON, A. S.; CARERE, M.; MAGGI, C.; TUSIL, P.; SOLDAN, P.; JAMES, A.; SANCHEZ, W.; DULIO, V.; BROEG, K.; REIFFERSCHIED, G.; BUCHINGER, S.; MAAS, H.; GRINTEN, E. V. D.; O'TOOLE, S.; AUSILI, A.; MANFRA, L.; MARZIALI, L.; POLESSELLO, S.; LACCHETTI, I.; MANCINI, L.; LILJA, K.; LINDEROTH, M.; LUNDEBERG, T.; FJÄLLBORG, B.; PORSBRING, T.; LARSSON, D. G. J.; BENGTSSON-PALME, J.; FÖRLIN, L.; KIENTLE, C.; KUNZ, P.; VERMEIRSEN, E.; WERNER, I.; ROBINSON, C. D.; LYONS, B.; KATSIADAKI, I.; WHALLEY, C.; HAAN,

K. D.; MESSIAEN, M.; CLAYTON, H.; LETTIERI, T.; CARVALHO, R. N.; GAWLIK, B. M.; HOLLERT, H.; PAOLO, C. D.; BRACK, W.; KAMMANN, U.; KASE, R. The European technical report on aquatic effect-based monitoring tools under the water framework directive. **Environmental Sciences Europe**, v. 27, n. 7, 2015.

WETHERILL, Y.B.; PETRE, C.E.; MONK, K.R.; PUGA, A.; KNUDSEN, K.E. The xenoestrogen bisphenol A induces inappropriate androgen receptor activation and mitogenesis in prostatic adenocarcinoma cells. **Molecular Cancer Therapeutics**, v. 1, p. 515–524, 2002.

WU, D.; WANG, T.; HUANG, X.; DOLFING, J.; XIE, B. Perspective of harnessing energy from landfill leachate via microbial fuel cells: novel biofuels and electrogenic physiologies. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 99, n. 19, p. 7827-7836, 2015.

WU H.; ZHONGA M.; LU Z.; SHAN X.; LI F.; JI C.; CONGA M. Biological effects of tris (1-chloro-2-propyl) phosphate (TCPP) on immunity in mussel *Mytilus galloprovincialis*. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 61, p. 102–106, 2018.

YANG, A. L.; ZHULEI, C. Z.; LIUB, T. Ecological effects of cow manure compost on soils contaminated by landfill leachate. **Ecological Indicators**, v. 32, p. 14–18, 2013.

ZAIRI, M.; AYDI, A.; DHIA, H. N. Leachate generation and biogas energy recovery in the Jebel Chakir municipal solid waste landfill. Tunisia. **Journal of Material Cycles and Waste Management**, v. 16, n. 1, p. 141-150, 2014.

ZHANG L.; LIU X.; VOCÊ L.; ZHOU D.; WANG Q.; LI F.; CONG H.; LI G.; ZHAO J.; LIU D.; YU J.; WU H. Benzo(a)pyrene-induced metabolic responses in Manila clam *Ruditapes philippinarum* by proton nuclear magnetic resonance (¹H NMR) based metabolomics. **Environ Toxicol Pharmacol**, v. 32, n. 2, p. 218- 225, 2011.

ANEXOS

ANALISE FÍSICO-QUÍMICA DO LIXIVIADO DOS PONTOS DE COLETA.



Instituto SENAI de Tecnologia em Meio Ambiente e Química
Laboratório Central

RELATÓRIO DE ENSAIOS 1345 / 2018

Data: 23/03/2018

Cliente: CAVO Serviços e Saneamento S/A - Aterro Sanitário Cachimba

Endereço: Rua João Negrão, 1517 - Rebouças - Curitiba / PR

DADOS DA AMOSTRA

Local da amostragem: **Entrada da Equalização**

Tipo de amostra: **Chorume**

Amostragem: tipo **Simples** responsável **SENAI-CIC** data **19/02/18** hora **10h00min** Condições Ambientais:
Tempo Bom

Entrada no laboratório: data **19/02/18** horário **17h23min**

Ensaio	Resultado	Incerteza de Medição	CEMA 086/13	Unidade	Data de Conclusão	Metodologia
Ensaios por Cromatografia (Gasosa-CG/Líquida-HPLC/Iônica-IC)						
Ânions						
Fluoreto	< 0,10	-----	10,0	mg/L	20/02/18	IC – EPA 300.0
Sulfeto Total	0,14	-----	1,0	mg/L	20/02/18	IC - SMWW 4500 S ²⁻ F
Cianeto Total	< 0,05	-----	1,0	mg/L	20/02/18	IC - SMWW 4500-CN ⁻
Cianeto Livre	< 0,05	-----	0,2	mg/L	20/02/18	IC - SMWW 4500-CN ⁻
Trihalometanos (THM)						
Clorofórmio	0,038	±0,006	1	mg/L	21/02/18	GC/MS – EN ISO 10301
Compostos Orgânicos Voláteis (VOC)						
1,1-Dicloroetano	< 0,005	-----	1,0	mg/L	20/02/18	GC/MS – EN ISO 10301
Cloreto de Vinila	< 5,0	-----	Não definido	µg/L	20/02/18	GC/MS – EN ISO 10301
Tetracloroeto de Carbono	< 0,005	-----	1,0	mg/L	20/02/18	GC/MS – EN ISO 10301
Tricloroetano	< 0,005	-----	1,0	mg/L	20/02/18	GC/MS – EN ISO 10301
Estireno	< 0,005	-----	0,07	mg/L	21/02/18	GC/MS – EN ISO 10301
BTEX						
Benzeno	< 0,020	-----	1,2	mg/L	20/02/18	GC/FID – DIN 38407 F9
Tolueno	< 0,020	-----	1,2	mg/L	20/02/18	GC/FID – DIN 38407 F9
Etilbenzeno	< 0,020	-----	0,84	mg/L	20/02/18	GC/FID – DIN 38407 F9
<i>m,p</i> -Xileno	< 0,020	-----	Xileno < 1,6	mg/L	20/02/18	GC/FID – DIN 38407 F9
<i>o</i> -Xileno	< 0,020	-----	Xileno < 1,6	mg/L	20/02/18	GC/FID – DIN 38407 F9
Ensaios Amostragem em Campo						
Oxigênio Dissolvido	1,89	± 0,37	Não definido	mgO ₂ /L	19/02/18	SMWW 4500-O
Temperatura Amostra	29,0	-----	< 40°C	°C	19/02/18	SMWW 2550 B
Temperatura Ambiente	23,0	-----	Não definido	°C	19/02/18	SMWW 2550 B
pH	8,10	± 0,31	5-9	---	19/02/18	SMWW 4500 H ⁺ B
Materiais Flutuantes	Ausente	-----	Não definido	---	19/02/18	Observação Visual



Instituto SENAI de Tecnologia em Meio Ambiente e Química
Laboratório Central

RELATÓRIO DE ENSAIOS 1345 / 2018

Data: 23/03/2018

Ensaio	Resultado	Incerteza de Medição	CEMA 086/13	Unidade	Data de Conclusão	Metodologia
Ensaio Metais por Espectrometria						
Arsênio	< 0,10	-----	0,50	mg/L	27/02/18	ICP/OES – SMWW 3120 B
Bário	0,29	± 0,03	5,00	mg/L	27/02/18	ICP/OES – SMWW 3120 B
Boro	0,60	± 0,09	5,00	mg/L	27/02/18	ICP/OES – SMWW 3120 B
Cádmio	< 0,05	-----	0,20	mg/L	27/02/18	ICP/OES – SMWW 3120 B
Chumbo	0,0100	± 0,0008	0,50	mg/L	27/02/18	ICP/OES – SMWW 3120 B
Cobre Dissolvido	< 0,05	-----	1,00	mg/L	27/02/18	ICP/OES – SMWW 3120 B
Cromo Total	0,110	± 0,005	Não Definido	mg/L	26/02/18	EAA/CH – SMWW 3111 D
Cromo Trivalente	0,060	± 0,003	1,00	mg/L	26/02/18	EAA/CH – SMWW 3111 D
Cromo Hexavalente	0,050	± 0,003	0,10	mg/L	26/02/18	EAA/CH – SMWW 3111 D
Estanho	< 0,10	-----	4,00	mg/L	27/02/18	ICP/OES – SMWW 3120 B
Ferro Dissolvido	1,93	± 0,11	15,00	mg/L	27/02/18	ICP/OES – SMWW 3120 B
Manganês Dissolvido	0,48	± 0,06	1,00	mg/L	27/02/18	ICP/OES – SMWW 3120 B
Mercúrio	< 0,001	-----	0,01	mg/L	02/03/18	EAA/GVF– SMWW 3112 B
Níquel	0,070	± 0,016	2,00	mg/L	27/02/18	ICP/OES – SMWW 3120 B
Prata	< 0,05	-----	0,10	mg/L	27/02/18	ICP/OES – SMWW 3120 B
Selênio	< 0,10	-----	0,30	mg/L	27/02/18	ICP/OES – SMWW 3120 B
Zinco	0,09	± 0,016	5,00	mg/L	27/02/18	ICP/OES – SMWW 3120 B
Ensaio Físico-Químicos						
Carbono Orgânico (*)	477	---	Não definido	mg/L	02/03/18	POP 089 Ed. 15
Demanda Bioquímica de Oxigênio-DBO ₅	74,71	± 5,87	(a)	mgO ₂ /L	26/02/18	SMWW 5210 B
Demanda Bioquímica de Oxigênio Solúvel –DBO ₅	50,36	± 3,96	Não definido	mgO ₂ /L	26/02/18	SMWW 5210 B
Demanda Bioquímica de Oxigênio-DBO ₂₀	260,55	---	Não definido	mgO ₂ /L	12/03/18	SMWW 5210 B
Demanda Química de Oxigênio-DQO	1.158,7	± 130,0	(a)	mgO ₂ /L	20/02/18	SMWW 5220 D
Demanda Química de Oxigênio Solúvel-DQO	867,5	± 97,3	Não definido	mgO ₂ /L	20/02/18	SMWW 5220 D
Fenóis Totais	< 0,05	---	0,5	mg/L	23/02/18	SMWW 5530 C
Nitrogênio Amoniacal	1.183,39	±221,17	20,0	mgN-NH ₃ /L	06/03/18	PFQL 067 rev03
Óleos e Graxas Animais/Vegetais	< 15	---	50	mg/L	01/03/18	Cálculo
Óleos Minerais	< 15	---	20	mg/L	01/03/18	SMWW 5520 D/F
Sólidos Sedimentáveis – 1 hora	< 15	---	1	mL/L	19/02/18	SMWW 2540 F



Instituto SENAI de Tecnologia em Meio Ambiente e Química
Laboratório Central

RELATÓRIO DE ENSAIOS 1345 / 2018

Data: 23/03/2018

REFERÊNCIAS

1. **CEMA 086:2013** = Estabelece diretrizes e critérios orientadores para o licenciamento e outorga, projeto, implantação, operação e encerramento de aterros sanitários, visando o controle da poluição, da contaminação e a minimização de seus impactos ambientais e dá outras providências.
2. **SMWW** = Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 22ªed., 2012.
3. **ABNT NBR** = Associação Brasileira de Normas Técnicas.
4. Para amostragem de água residual foi utilizada norma ABNT NBR 9898 de 1987.
5. **EPA** = Environmental Protection Agency.
6. **DIN** = Deutsches Institut für Normung – Instituto Alemão para Normatização.
7. **ISO** = International Organization for Standardization.
8. **Farm. Brasileira**: Farmacopeia Brasileira.
9. Preparo de amostra para determinação de metais conforme SMWW 3030B, 3030E e 3030F.
10. Preparo de amostra para determinação de cromo trivalente e cromo hexavalente baseado no EPA Método 7195.

OBSERVAÇÕES

1. Amostragem realizada conforme Plano de Amostragem e Dados de Campo 0135/2018.
2. (*) Ensaio realizado por laboratório subcontratado.
3. FID = Detector de Ionização de Chama; MS = Espectrômetro de Massas.
4. ICP/OES = Espectrometria de Emissão Óptica com Plasma Indutivamente Acoplado de Configuração Axial.
5. EAA = Espectrometria de Absorção Atômica; GVF = Gerador de Vapor à Frio; CH = Chama.
6. (a) 80% de redução do valor de entrada.
7. "O laboratório possui CCL (Certificado de Cadastro de Laboratório) de número 018A junto ao IAP".

RESPONSÁVEIS TÉCNICOS

Alexandre Emmel CRQ 09200788- Cromatografia e ATM

Debora G. da Silva-CRQ 09202356-Espectrometria

Maris R. Hamerski CRQ 09200731- Físico Químico

Andre Gomes Alves CRQ 09903719- Amostragem e ATM

.../acs



Instituto SENAI de Tecnologia em Meio Ambiente e Química
Laboratório Central

RELATÓRIO DE ENSAIOS 1350 / 2018

Data: 23/03/2018

Cliente: **CAVO Serviços e Saneamento S/A - Aterro Sanitário Cachimba**
Endereço: **Rua João Negrão, 1517 - Rebouças - Curitiba / PR**

DADOS DA AMOSTRA

Local da amostragem: **Saída da ETE**

Tipo de amostra: **Chorume**

Amostragem: tipo **Simples** responsável **SENAI-CIC** data **19/02/18** hora **10h33min** Condições Ambientais: **Tempo Bom**

Entrada no laboratório: data **19/02/18** horário **17h23min**

Ensaio	Resultado	Incerteza de Medição	CEMA 086/13	Unidade	Data de Conclusão	Metodologia
Ensaios por Cromatografia (Gasosa-CG/Líquida-HPLC/Iônica-IC)						
Ânions						
Fluoreto	< 0,10	-----	10,0	mg/L	20/02/18	IC – EPA 300.0
Nitrato	84,41	±13,62	Não definido	mgN-NO ₃ /L	20/02/18	IC – EPA 300.0
Nitrito	128,71	±8,74	Não definido	mgN-NO ₂ /L	20/02/18	IC – EPA 300.0
Sulfeto Total	< 0,05	-----	1,0	mg/L	20/02/18	IC - SMWW 4500 S ²⁻ F
Cianeto Total	< 0,05	-----	1,0	mg/L	20/02/18	IC - SMWW 4500-CN ⁻
Cianeto Livre	< 0,05	-----	0,2	mg/L	20/02/18	IC - SMWW 4500-CN ⁻
Trihalometanos (THM)						
Clorofórmio	< 0,005	-----	1	mg/L	21/02/18	GC/MS – EN ISO 10301
Compostos Orgânicos Voláteis (VOC)						
1,1-Dicloroetano	< 0,005	-----	1,0	mg/L	20/02/18	GC/MS – EN ISO 10301
Cloreto de Vinila	< 5,0	-----	Não definido	µg/L	20/02/18	GC/MS – EN ISO 10301
Tetracloreto de Carbono	< 0,005	-----	1,0	mg/L	20/02/18	GC/MS – EN ISO 10301
Tricloroetano	< 0,005	-----	1,0	mg/L	20/02/18	GC/MS – EN ISO 10301
Estireno	< 0,005	-----	0,07	mg/L	21/02/18	GC/MS – EN ISO 10301
Ensaios Amostragem em Campo						
Oxigênio Dissolvido	4,78	± 0,94	Não definido	mgO ₂ /L	19/02/18	SMWW 4500-O
Temperatura Amostra	24,2	-----	< 40°C	°C	19/02/18	SMWW 2550 B
Temperatura Ambiente	23,0	-----	Não definido	°C	19/02/18	SMWW 2550 B
pH	8,85	± 0,34	5-9	---	19/02/18	SMWW 4500 H ⁺ B
Materiais Flutuantes	Ausente	-----	Não definido	---	19/02/18	Observação Visual



Instituto SENAI de Tecnologia em Meio Ambiente e Química
Laboratório Central

RELATÓRIO DE ENSAIOS 1350 / 2018

Data: 23/03/2018

Ensaio	Resultado	Incerteza de Medição	CEMA 086/13	Unidade	Data de Conclusão	Metodologia
Ensaio Metais por Espectrometria						
Arsênio	< 0,10	-----	0,50	mg/L	27/02/18	ICP/OES – SMWW 3120 B
Bário	0,19	± 0,02	5,00	mg/L	27/02/18	ICP/OES – SMWW 3120 B
Boro	0,57	± 0,09	5,00	mg/L	27/02/18	ICP/OES – SMWW 3120 B
Cádmio	< 0,05	-----	0,20	mg/L	27/02/18	ICP/OES – SMWW 3120 B
Chumbo	< 0,01	-----	0,50	mg/L	27/02/18	ICP/OES – SMWW 3120 B
Cobre Dissolvido	< 0,05	-----	1,00	mg/L	27/02/18	ICP/OES – SMWW 3120 B
Cromo Total	0,100	± 0,004	Não Definido	mg/L	26/02/18	EAA/CH – SMWW 3111 D
Cromo Trivalente	< 0,05	-----	1,00	mg/L	26/02/18	EAA/CH – SMWW 3111 D
Cromo Hexavalente	0,06	± 0,004	0,10	mg/L	26/02/18	EAA/CH – SMWW 3111 D
Estanho	< 0,10	-----	4,00	mg/L	27/02/18	ICP/OES – SMWW 3120 B
Ferro Dissolvido	2,83	± 0,17	15,00	mg/L	27/02/18	ICP/OES – SMWW 3120 B
Manganês Dissolvido	0,28	± 0,06	1,00	mg/L	27/02/18	ICP/OES – SMWW 3120 B
Mercúrio	< 0,001	-----	0,01	mg/L	02/03/18	EAA/GVF– SMWW 3112 B
Níquel	0,070	± 0,016	2,00	mg/L	27/02/18	ICP/OES – SMWW 3120 B
Prata	< 0,05	-----	0,10	mg/L	27/02/18	ICP/OES – SMWW 3120 B
Selênio	< 0,10	-----	0,30	mg/L	27/02/18	ICP/OES – SMWW 3120 B
Zinco	0,060	± 0,016	5,00	mg/L	27/02/18	ICP/OES – SMWW 3120 B
Ensaio Físico-Químicos						
Carbono Orgânico (*)	288	---	Não definido	mg/L	02/03/18	POP 089 Ed. 15
Demanda Bioquímica de Oxigênio-DBO ₅	19,53	± 1,53	(a)	mgO ₂ /L	26/02/18	SMWW 5210 B
Demanda Bioquímica de Oxigênio Solúvel –DBO ₅	18,71	± 1,47	Não definido	mgO ₂ /L	26/02/18	SMWW 5210 B
Demanda Bioquímica de Oxigênio-DBO ₂₀	156,26	---	Não definido	mgO ₂ /L	13/03/18	SMWW 5210 B
Demanda Química de Oxigênio-DQO	792,4	± 88,9	(a)	mgO ₂ /L	20/02/18	SMWW 5220 D
Demanda Química de Oxigênio Solúvel-DQO	716,1	± 80,4	Não definido	mgO ₂ /L	20/02/18	SMWW 5220 D
Fenóis Totais	< 0,05	---	0,5	mg/L	23/02/18	SMWW 5530 C
Nitrogênio Amoniacal	139,6	± 26,1	20,0	mgN-NH ₃ /L	22/02/18	PFQL 067 rev03
Óleos e Graxas Animais/Vegetais	< 15	---	50	mg/L	02/03/18	Cálculo
Óleos Minerais	< 15	---	20	mg/L	02/03/18	SMWW 5520 D/F
Sólidos Sedimentáveis–1 hora	< 0,1	---	1	mL/L	20/02/18	SMWW 2540 F



Instituto SENAI de Tecnologia em Meio Ambiente e Química
Laboratório Central

RELATÓRIO DE ENSAIOS 1350 / 2018

Data: 23/03/2018

REFERÊNCIAS

1. **CEMA 086:2013** = Estabelece diretrizes e critérios orientadores para o licenciamento e outorga, projeto, implantação, operação e encerramento de aterros sanitários, visando o controle da poluição, da contaminação e a minimização de seus impactos ambientais e dá outras providências.
2. **SMWW** = Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 22ªed., 2012.
3. **ABNT NBR** = Associação Brasileira de Normas Técnicas.
4. Para amostragem de água residual foi utilizada norma ABNT NBR 9898 de 1987.
5. **EPA** = Environmental Protection Agency.
6. **DIN** = Deutsches Institut für Normung – Instituto Alemão para Normatização.
7. **ISO** = International Organization for Standardization.
8. **PFQL** = Procedimento Interno.
9. Preparo de amostra para determinação de metais conforme SMWW 3030B, 3030E e 3030F.
10. Preparo de amostra para determinação de cromo trivalente e cromo hexavalente baseado no EPA Método 7195.

OBSERVAÇÕES

1. Amostragem realizada conforme Plano de Amostragem e Dados de Campo 0135/2018.
2. (*) Ensaio realizado por laboratório subcontratado.
3. **FID** = Detector de Ionização de Chama; **MS** = Espectrômetro de Massas.
4. **ICP/OES** = Espectrometria de Emissão Óptica com Plasma Indutivamente Acoplado de Configuração Axial.
5. **EAA** = Espectrometria de Absorção Atômica; **CH** = Chama; **GVP** = Gerador de Vapor à Frio.
6. (a) 80% de redução do valor de entrada.
7. "O laboratório possui CCL (Certificado de Cadastro de Laboratório) de número 018A junto ao IAP".

RESPONSÁVEIS TÉCNICOS

Alexandre Emmel CRQ 09200788- Cromatografia e ATM

Debora G. da Silva-CRQ 09202356-Espectrometria

Maris R. Hamerski CRQ 09200731- Físico Químico

Andre Gomes Alves CRQ 09903719- Amostragem e ATM

.../jmm



Instituto SENAI de Tecnologia em Meio Ambiente e Química
Laboratório Central

RELATÓRIO DE ENSAIOS 1359 / 2018

Data: 23/03/2018

Cliente: **CAVO Serviços e Saneamento S/A - Aterro Sanitário Cachimba**

Endereço: **Rua João Negrão, 1517 - Rebouças - Curitiba / PR**

DADOS DA AMOSTRA

Local da amostragem: **Saída da Wetland 03**

Tipo de amostra: **Chorume**

Amostragem: tipo **Simples** responsável **SENAI-CIC** data **19/02/18** hora **11h06min** Condições Ambientais:
Tempo Bom

Entrada no laboratório: data **19/02/18** horário **17h23min**

Ensaio	Resultado	Incerteza de Medição	CEMA 086/13	Unidade	Data de Conclusão	Metodologia
Ensaios por Cromatografia (Gasosa-CG/Líquida-HPLC/Iônica-IC)						
Ânions						
Fluoreto	< 0,10	-----	10,0	mg/L	20/02/18	IC – EPA 300.0
Nitrato	< 0,11	-----	Não definido	mgN-NO ₃ ⁻ /L	20/02/18	IC – EPA 300.0
Nitrito	< 0,15	-----	Não definido	mgN-NO ₂ ⁻ /L	20/02/18	IC – EPA 300.0
Fosfato	< 1,00	-----	Não definido	mg/L	20/02/18	IC – EPA 300.0
Sulfeto Total	0,06	-----	1,0	mg/L	20/02/18	IC - SMWW 4500 S ²⁻ F
Cianeto Total	< 0,05	-----	1,0	mg/L	20/02/18	IC - SMWW 4500-CN ⁻
Cianeto Livre	< 0,05	-----	0,2	mg/L	20/02/18	IC - SMWW 4500-CN ⁻
Trihalometanos (THM)						
Clorofórmio	< 0,005	-----	1	mg/L	21/02/18	GC/MS – EN ISO 10301
Compostos Orgânicos Voláteis (VOC)						
1,1-Dicloroetano	< 0,005	-----	1,0	mg/L	20/02/18	GC/MS – EN ISO 10301
Cloreto de Vinila	< 5,0	-----	Não definido	µg/L	20/02/18	GC/MS – EN ISO 10301
Tetracloreto de Carbono	< 0,005	-----	1,0	mg/L	20/02/18	GC/MS – EN ISO 10301
Tricloroetano	< 0,005	-----	1,0	mg/L	20/02/18	GC/MS – EN ISO 10301
Estireno	< 0,005	-----	0,07	mg/L	21/02/18	GC/MS – EN ISO 10301
BTEX						
Benzeno	< 0,020	-----	1,2	mg/L	20/02/18	GC/FID – DIN 38407 F9
Tolueno	< 0,020	-----	1,2	mg/L	20/02/18	GC/FID – DIN 38407 F9
Etilbenzeno	< 0,020	-----	0,84	mg/L	20/02/18	GC/FID – DIN 38407 F9
<i>m,p</i> -Xileno	< 0,020	-----	Xileno < 1,6	mg/L	20/02/18	GC/FID – DIN 38407 F9
<i>o</i> -Xileno	< 0,020	-----	Xileno < 1,6	mg/L	20/02/18	GC/FID – DIN 38407 F9
Ensaios Amostragem em Campo						
Oxigênio Dissolvido	4,64	± 0,92	Não definido	mgO ₂ /L	19/02/18	SMWW 4500-O
Temperatura Amostra	22,7	-----	< 40°C	°C	19/02/18	SMWW 2550 B
Temperatura Ambiente	23,0	-----	Não definido	°C	19/02/18	SMWW 2550 B
pH	7,88	± 0,30	5-9	---	19/02/18	SMWW 4500 H ⁺ B
Materiais Flutuantes	Ausente	-----	Não definido	---	19/02/18	Observação Visual

Rua Senador Accioly Filho, 298 | 81310-000 | Curitiba/PR | 41 3271-7158 | senaipr.org.br | labambiental@pr.senai.br/ labambiental@sistemafiep.org.br

OS RESULTADOS APLICAM-SE À AMOSTRA CONFORME RECEBIDA. SOMENTE PERMITIDA REPRODUÇÃO INTEGRAL DESSE RELATÓRIO.

RGE 007-01/16

Pág 1/4



Instituto SENAI de Tecnologia em Meio Ambiente e Química
Laboratório Central

RELATÓRIO DE ENSAIOS 1359 / 2018					Data: 23/03/2018	
Ensaio	Resultado	Incerteza de Medição	CEMA 086/13	Unidade	Data de Conclusão	Metodologia
Ensaio Metais por Espectrometria						
Arsênio	< 0,10	-----	0,50	mg/L	27/02/18	ICP/OES – SMWW 3120 B
Bário	0,11	± 0,02	5,00	mg/L	27/02/18	ICP/OES – SMWW 3120 B
Boro	0,45	± 0,07	5,00	mg/L	27/02/18	ICP/OES – SMWW 3120 B
Cádmio	< 0,05	-----	0,20	mg/L	27/02/18	ICP/OES – SMWW 3120 B
Chumbo	< 0,01	-----	0,50	mg/L	27/02/18	ICP/OES – SMWW 3120 B
Cobre Dissolvido	< 0,05	-----	1,00	mg/L	27/02/18	ICP/OES – SMWW 3120 B
Cromo Total	0,070	± 0,003	Não Definido	mg/L	26/02/18	EAA/CH – SMWW 3111 D
Cromo Trivalente	< 0,05	-----	1,00	mg/L	26/02/18	EAA/CH – SMWW 3111 D
Cromo Hexavalente	0,05	± 0,003	0,10	mg/L	26/02/18	EAA/CH – SMWW 3111 D
Estanho	< 0,10	-----	4,00	mg/L	27/02/18	ICP/OES – SMWW 3120 B
Ferro Dissolvido	1,49	± 0,09	15,00	mg/L	27/02/18	ICP/OES – SMWW 3120 B
Manganês Dissolvido	0,15	± 0,06	1,00	mg/L	27/02/18	ICP/OES – SMWW 3120 B
Mercúrio	< 0,001	-----	0,01	mg/L	02/03/18	EAA/GVF– SMWW 3112 B
Níquel	0,04	± 0,01	2,00	mg/L	27/02/18	ICP/OES – SMWW 3120 B
Prata	< 0,05	-----	0,10	mg/L	27/02/18	ICP/OES – SMWW 3120 B
Selênio	< 0,10	-----	0,30	mg/L	27/02/18	ICP/OES – SMWW 3120 B
Zinco	< 0,05	-----	5,00	mg/L	27/02/18	ICP/OES – SMWW 3120 B
Ensaio Físico-Químicos						
Carbono Orgânico (*)	102	---	Não definido	mg/L	02/03/18	POP 089 Ed. 15
Demanda Bioquímica de Oxigênio-DBO ₅	14,49	±1,14	(a)	mgO ₂ /L	26/02/18	SMWW 5210 B
Demanda Bioquímica de Oxigênio Solúvel –DBO ₅	11,79	±0,93	Não definido	mgO ₂ /L	26/02/18	SMWW 5210 B
Demanda Bioquímica de Oxigênio-DBO ₂₀	58,50	---	Não definido	mgO ₂ /L	13/03/18	SMWW 5210 B
Demanda Química de Oxigênio-DQO	423,0	±47,0	(a)	mgO ₂ /L	20/02/18	SMWW 5220 D
Demanda Química de Oxigênio Solúvel-DQO	327,8	±36,8	Não definido	mgO ₂ /L	22/02/18	SMWW 5220 D
Fenóis Totais	< 0,05	---	0,5	mg/L	23/02/18	SMWW 5530 C
Fósforo Total	4,35	---	Não Definido	mg/L	26/02/18	PFQL 066 rev03
Nitrogênio Amoniacal	2,86	±0,53	20,0	mgN-NH ₃ /L	22/02/18	PFQL 067 rev03
Nitrogênio Orgânico	17,99	---	Não definido	mgN-N _{Org} /L	23/02/18	Cálculo
Nitrogênio Total	20,85	±1,42	Não definido	mgN _{Total} /L	23/02/18	PFQL 067 rev02
Óleos e Graxas Animais/Vegetais	< 15	---	50	mg/L	02/03/18	Cálculo
Óleos Minerais	< 15	---	20	mg/L	02/03/18	SMWW 5520 D/F
Sólidos Suspensos Totais	18	---	Não definido	mg/L	22/02/18	SMWW 2540 D

Rua Senador Accioly Filho, 298 | 81310-000 | Curitiba/PR | 41 3271-7158 | senaipr.org.br | labambiental@pr.senai.br/ labambiental@sistemafiep.org.br

OS RESULTADOS APLICAM-SE À AMOSTRA CONFORME RECEBIDA. SOMENTE PERMITIDA REPRODUÇÃO INTEGRAL DESSE RELATÓRIO.

RGE 007-01/16

Pág 2/4



Instituto SENAI de Tecnologia em Meio Ambiente e Química
Laboratório Central

RELATÓRIO DE ENSAIOS 1359 / 2018

Data: 23/03/2018

Ensaio	Resultado	Incerteza de Medição	CEMA 086/13	Unidade	Data de Conclusão	Metodologia
Ensaio Físico-Químicos						
Sólidos Totais	4.771	---	Não definido	mg/L	07/03/18	SMWW 2540 B
Sólidos Sedimentáveis – 1 hora	0,10	± 0,03	1	mL/L	20/02/18	SMWW 2540 F

Ensaio	Resultado	Incerteza de Medição	CEMA 086/13	Unidade	Data de Conclusão	Metodologia
Ensaio Ensaio Limnológicos						
Densidade Cianobactérias (*)	802	120	Não definido	Cél./ mL	02/03/18	CETESB L 5.303 – 2012

Ensaio	Resultado	Incerteza de Medição	CEMA 081/2010	Unidade	Data de Conclusão	Metodologia
Ensaio Ecotoxicológicos						
Toxicidade aguda ao microcrustáceo <i>Daphnia magna</i>	1	-----	Não definido	FTd	23/02/18	ABNT NBR 12713 – 2016
Toxicidade aguda à bactéria <i>Vibrio fischeri</i>	1	-----	Não definido	FTbl	22/02/18	ABNT NBR 15411-3 – 2012
Toxicidade crônica à alga <i>Desmodesmus subspicatus</i>	1	----	4	FTa	23/02/18	ABNT NBR 12648 – 2011

REFERÊNCIAS

1. **CEMA 086:2013** = Estabelece diretrizes e critérios orientadores para o licenciamento e outorga, projeto, implantação, operação e encerramento de aterros sanitários, visando o controle da poluição, da contaminação e a minimização de seus impactos ambientais e dá outras providências.
2. **Resolução N° 081/2010 CEMA** = Critérios e Padrões de Ecotoxicidade para o Controle de Efluentes Líquidos Lançados em Águas Superficiais no Estado do Paraná.
3. **SMWW** = Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 22ªed., 2012.
4. **ABNT NBR** = Associação Brasileira de Normas Técnicas.
5. Para amostragem de água residual foi utilizada norma ABNT NBR 9898 de 1987.
6. **EPA** = Environmental Protection Agency.
7. **DIN** = Deutsches Institut für Normung – Instituto Alemão para Normatização.
8. **ISO** = International Organization for Standardization.
9. **POP** = Procedimento Operacional Padrão.
10. **PFQL** = Procedimento Interno.
11. Preparo de amostra para determinação de metais conforme SMWW 3030B, 3030E e 3030F.
12. Preparo de amostra para determinação de cromo trivalente e cromo hexavalente baseado no EPA Método 7195.



Instituto SENAI de Tecnologia em Meio Ambiente e Química
Laboratório Central

RELATÓRIO DE ENSAIOS 1359 / 2018

Data: 23/03/2018

OBSERVAÇÕES

1. Amostragem realizada conforme Plano de Amostragem e Dados de Campo 0135/2018.
2. (*) Ensaio realizado por laboratório subcontratado.
3. (a) 80% de redução do valor de entrada.
4. ICP/OES = Espectrometria de Emissão Óptica com Plasma Indutivamente Acoplado com Configuração Axial.
5. EAA= Espectrometria de Absorção Atômica; CH= Chama; GVF= Gerador de Vapor à Frio.
6. (a) 80% de redução do valor de entrada.
7. FTbl = Fator de Toxicidade Aguda para bactéria luminescente *Vibrio fischeri*.
8. FTd = Fator de Toxicidade Aguda para Microcrustáceo *Daphnia magna*.
9. FTa = Fator de Toxicidade Crônica para algas Clorofíceas *Desmodesmus subspicatus*.
10. Amostra congelada para os ensaios ecotoxicológicos.
11. Para o ensaio de Densidade de Cianobactérias amostra preservada com Lugol.
12. "O laboratório possui CCL (Certificado de Cadastramento de Laboratório) de número 018A junto ao IAP".

RESPONSÁVEIS TÉCNICOS

Alexandre Emmel CRQ 09200788- Cromatografia e ATM

Debora G. da Silva-CRQ 09202356-Espectrometria

Juliane Moreira Emmel CRB 41792-07- Microbiologia

Maris R. Hamerski CRQ 09200731- Fisico Químico

Andre Gomes Alves CRQ 09903719- Amostragem e ATM

.../acs

AUTORIZAÇÃO PARA ATIVIDADES COM FINALIDADE CIENTÍFICA.



Ministério do Meio Ambiente - MMA
Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio
Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 60574-1	Data da Emissão: 03/10/2017 09:28	Data para Revalidação*: 02/11/2018
* De acordo com o art. 28 da IN 03/2014, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão.		

Dados do titular

Nome: Juliani Giselli Prestes	CPF: 091.203.769-52
Título do Projeto: Potencial biorremediador e biomonitor de bivalves límnicos dos gêneros Corbicula (Mollusca, Bivalvia, Corbiculidae) e Diplodon (Mollusca, Bivalvia, Hyriidae), para lixiviado gerado em aterro sanitário.	
Nome da Instituição : UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ	CNPJ: 75.095.679/0001-49

Cronograma de atividades

#	Descrição da atividade	Início (mês/ano)	Fim (mês/ano)
1	coleta de bivalves límnicos	10/2017	06/2019

Observações e ressalvas

1	As atividades de campo exercidas por pessoa natural ou jurídica estrangeira, em todo o território nacional, que impliquem o deslocamento de recursos humanos e materiais, tendo por objeto coletar dados, materiais, espécimes biológicos e minerais, peças integrantes da cultura nativa e cultura popular, presente e passada, obtidos por meio de recursos e técnicas que se destinem ao estudo, à difusão ou à pesquisa, estão sujeitas a autorização do Ministério de Ciência e Tecnologia.
2	Esta autorização NAO exime o pesquisador titular e os membros de sua equipe da necessidade de obter as anuências previstas em outros instrumentos legais, bem como do consentimento do responsável pela área, pública ou privada, onde será realizada a atividade, inclusive do órgão gestor de terra indígena (FUNAI), da unidade de conservação estadual, distrital ou municipal, ou do proprietário, arrendatário, posseiro ou morador de área dentro dos limites de unidade de conservação federal cujo processo de regularização fundiária encontra-se em curso.
3	Este documento somente poderá ser utilizado para os fins previstos na Instrução Normativa ICMBio nº 03/2014 ou na Instrução Normativa ICMBio nº 10/2010, no que especifica esta Autorização, não podendo ser utilizado para fins comerciais, industriais ou esportivos. O material biológico coletado deverá ser utilizado para atividades científicas ou didáticas no âmbito do ensino superior.
4	A autorização para envio ao exterior de material biológico não consignado deverá ser requerida por meio do endereço eletrônico www.ibama.gov.br (Serviços on-line - Licença para importação ou exportação de flora e fauna - CITES e não CITES).
5	O titular de licença ou autorização e os membros da sua equipe deverão optar por métodos de coleta e instrumentos de captura direcionados, sempre que possível, ao grupo taxonômico de interesse, evitando a morte ou dano significativo a outros grupos; e empregar esforço de coleta ou captura que não comprometa a viabilidade de populações do grupo taxonômico de interesse em condição in situ.
6	O titular de autorização ou de licença permanente, assim como os membros de sua equipe, quando da violação da legislação vigente, ou quando da inadequação, omissão ou falsa descrição de informações relevantes que subsidiaram a expedição do ato, poderá, mediante decisão motivada, ter a autorização ou licença suspensa ou revogada pelo ICMBio, nos termos da legislação brasileira em vigor.
7	Este documento não dispensa o cumprimento da legislação que dispõe sobre acesso a componente do patrimônio genético existente no território nacional, na plataforma continental e na zona econômica exclusiva, ou ao conhecimento tradicional associado ao patrimônio genético, para fins de pesquisa científica, bioprospecção e desenvolvimento tecnológico. Veja maiores informações em www.mma.gov.br/cgen .
8	Em caso de pesquisa em UNIDADE DE CONSERVAÇÃO, o pesquisador titular desta autorização deverá contactar a administração da unidade a fim de CONFIRMAR AS DATAS das expedições, as condições para realização das coletas e de uso da infra-estrutura da unidade.

Locais onde as atividades de campo serão executadas

#	Município	UF	Descrição do local	Tipo
1	CAMPO MAGRO	PR	APA do rio Verde	Fora de UC Federal

Atividades X Táxons

#	Atividade	Táxons
1	Captura de animais silvestres in situ	Corbicula fluminea, Hyriidae
2	Coleta/transporte de amostras biológicas ex situ	Hyriidae, Corbicula fluminea
3	Coleta/transporte de espécimes da fauna silvestre in situ	Hyriidae (*Qtde: 180), Corbicula fluminea (*Qtde: 500)

* Quantidade de indivíduos por espécie, por localidade ou unidade de conservação, a serem coletados durante um ano.

Material e métodos

Este documento (Autorização para atividades com finalidade científica) foi expedido com base na Instrução Normativa nº 03/2014. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na Internet (www.icmbio.gov.br/sisbio).

Código de autenticação: 77563141



Página 1/4



Ministério do Meio Ambiente - MMA
Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio
Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 60574-1	Data da Emissão: 03/10/2017 09:28	Data para Revalidação*: 02/11/2018
* De acordo com o art. 28 da IN 03/2014, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão.		

Dados do titular

Nome: Juliani Giselli Prestes	CPF: 091.203.769-52
Título do Projeto: Potencial biorremediador e biomonitor de bivalves límnicos dos gêneros Corbicula (Mollusca, Bivalvia, Corbiculidae) e Diplodon (Mollusca, Bivalvia, Hyriidae), para lixiviado gerado em aterro sanitário.	
Nome da Instituição : UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ	CNPJ: 75.095.679/0001-49

1	Amostras biológicas (Invertebrados Aquáticos)	Outras amostras biológicas (tecido das brânquias e glândula digestiva)
2	Método de captura/coleta (Invertebrados Aquáticos)	Coleta manual, Captura manual, Peneira, Outros métodos de captura/coleta (seleção por tamanho), Outros petrechos (pinça)
3	Método de marcação (Invertebrados Aquáticos)	Etiquetas e/ou pinos

Destino do material biológico coletado

#	Nome local destino	Tipo Destino
1	UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ	

Este documento (Autorização para atividades com finalidade científica) foi expedido com base na Instrução Normativa nº 03/2014. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na Internet (www.icmbio.gov.br/sisbio).

Código de autenticação: 77563141



Página 2/4



Ministério do Meio Ambiente - MMA
Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio
Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 60574-1	Data da Emissão: 03/10/2017 09:28	Data para Revalidação*: 02/11/2018
* De acordo com o art. 28 da IN 03/2014, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão.		

Dados do titular

Nome: Juliani Giselli Prestes	CPF: 091.203.769-52
Título do Projeto: Potencial biorremediador e biomonitor de bivalves límnicos dos gêneros Corbicula (Mollusca, Bivalvia, Corbiculidae) e Diplodon (Mollusca, Bivalvia, Hyriidae), para lixiviado gerado em aterro sanitário.	
Nome da Instituição : UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ	CNPJ: 75.095.679/0001-49

Registro de coleta imprevista de material biológico

De acordo com a Instrução Normativa nº 03/2014, a coleta imprevista de material biológico ou de substrato não contemplado na autorização ou na licença permanente deverá ser anotada na mesma, em campo específico, por ocasião da coleta, devendo esta coleta imprevista ser comunicada por meio do relatório de atividades. O transporte do material biológico ou do substrato deverá ser acompanhado da autorização ou da licença permanente com a devida anotação. O material biológico coletado de forma imprevista, deverá ser destinado à instituição científica e, depositado, preferencialmente, em coleção biológica científica registrada no Cadastro Nacional de Coleções Biológicas (CCBIO).

Táxon*	Qtde.	Tipo de amostra	Qtde.	Data

Este documento (Autorização para atividades com finalidade científica) foi expedido com base na Instrução Normativa nº 03/2014. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na Internet (www.icmbio.gov.br/sisbio).

Código de autenticação: 77563141



Página 3/4



Ministério do Meio Ambiente - MMA
Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio
Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 60574-1	Data da Emissão: 03/10/2017 09:28	Data para Revalidação*: 02/11/2018
* De acordo com o art. 28 da IN 03/2014, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão.		

Dados do titular

Nome: Juliani Giselli Prestes	CPF: 091.203.769-52
Título do Projeto: Potencial biorremediador e biomonitor de bivalves límnicos dos gêneros Corbicula (Mollusca, Bivalvia, Corbiculidae) e Diplodon (Mollusca, Bivalvia, Hyriidae), para lixiviado gerado em aterro sanitário.	
Nome da Instituição : UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ	CNPJ: 75.095.679/0001-49

* Identificar o espécime no nível taxonômico possível.

Este documento (Autorização para atividades com finalidade científica) foi expedido com base na Instrução Normativa nº 03/2014. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na Internet (www.icmbio.gov.br/sisbio).

Código de autenticação: 77563141



Página 4/4